

End of Result Set



Generate Collection

L29: Entry 4 of 4

File: DWPI

Aug 24, 1999

DERWENT-ACC-NO: 1996-107680

DERWENT-WEEK: 199941

COPYRIGHT 2000 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Prodn. of fatty acids or derivs. from transgenic oilseed plants -
engineered to express a lipase that contacts lipid(s) only when seeds are milled

INVENTOR: ALIBERT, G; BOUDET, A ; MOULOUNGUI, Z

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE

CODE

INST NAT POLYTECHNIQUE TOULOUSE

NAPON

PRIORITY-DATA:

1994FR-0009272

July 25, 1994

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
US 5942659 A	August 24, 1999	N/A	000	C12N005/14
FR 2722798 A1	January 26, 1996	N/A	032	C12P007/64
WO 9603511 A2	February 8, 1996	F	032	C12N015/55
AU 9529849 A	February 22, 1996	N/A	000	C12N015/55
WO 9603511 A3	April 25, 1996	N/A	000	C12P007/64
EP 770134 A1	May 2, 1997	F	000	C12N015/55

DESIGNATED-STATES: AU BG CA CN HU JP NZ PL RO RU US AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE
IT LU MC NL PT SE AT DE ES FR GB IT

CITED-DOCUMENTS: 2.Jnl.Ref; EP 427309 ; EP 449376 ; WO 9106661 ; WO 9201042 ; WO
9205249 ; WO 9303161

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	APPL-DESCRIPTOR
US 5942659A	July 18, 1995	1995WO-FR00957	N/A
US 5942659A	January 24, 1997	1997US-0776210	N/A
US 5942659A	N/A	WO 9603511	Based on
FR 2722798A1	July 25, 1994	1994FR-0009272	N/A
WO 9603511A2	July 18, 1995	1995WO-FR00957	N/A
AU 9529849A	July 18, 1995	1995AU-0029849	N/A
AU 9529849A	N/A	WO 9603511	Based on
WO 9603511A3	July 18, 1995	1995WO-FR00957	N/A
EP 770134A1	July 18, 1995	1995EP-0925897	N/A
EP 770134A1	July 18, 1995	1995WO-FR00957	N/A
EP 770134A1	N/A	WO 9603511	Based on

INT-CL (IPC): A01H 5/00; A01H 5/10; C12N 5/14; C12N 15/52; C12N 15/55; C12N 15/82;
C12P 7/64

BASIC-ABSTRACT:

A novel method of producing fatty acids (A), or their derivs., from oilseed plants comprises: (1) producing transgenic oilseed plants having (a) at least one lipase gene (LG) encoding a lipase enzyme and (b) a promoter that allows expression of LG either in different (extra)cellular or tissue compartments from those where lipids accumulate or only after exogenous induction; (2) harvesting lipid-contg. seeds or fruits from these plants and milling them (opt. after treatment with an inducer of promoters used in (1), so that lipids and lipase come into contact; (3) incubating the mixt. so that lipids are hydrolysed enzymatically; and (4) extracting (A) produced or converting them to derivs.

USE - (A) are useful in prodn. of biofuels, lubricants, plant protection agents, detergents, etc.

ADVANTAGE - This method is suitable for large scale operation and uses only mild temp. and pressure conditions. It is simple and non-polluting (without prodn. of a glycerol by product). It can be carried out close to places where the plants are grown. The method requires no exogenous enzyme and by use of inducible promoters, premature contact between lipase and lipid is prevented.

ABSTRACTED-PUB-NO: US 5942659A

EQUIVALENT-ABSTRACTS:

A novel method of producing fatty acids (A), or their derivs., from oilseed plants comprises: (1) producing transgenic oilseed plants having (a) at least one lipase gene (LG) encoding a lipase enzyme and (b) a promoter that allows expression of LG either in different (extra)cellular or tissue compartments from those where lipids accumulate or only after exogenous induction; (2) harvesting lipid-contg. seeds or fruits from these plants and milling them (opt. after treatment with an inducer of promoters used in (1), so that lipids and lipase come into contact; (3) incubating the mixt. so that lipids are hydrolysed enzymatically; and (4) extracting (A) produced or converting them to derivs.

USE - (A) are useful in prodn. of biofuels, lubricants, plant protection agents, detergents, etc.

ADVANTAGE - This method is suitable for large scale operation and uses only mild temp. and pressure conditions. It is simple and non-polluting (without prodn. of a glycerol by product). It can be carried out close to places where the plants are grown. The method requires no exogenous enzyme and by use of inducible promoters, premature contact between lipase and lipid is prevented.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/1

DERWENT-CLASS: C06 D16 D23 E17 H06 H07 P13

CPI-CODES: C04-A0800E; C04-A10; C04-B01C1; D05-H16B; D10-B01; D10-B02; E10-C04K; H06-B; H07-A;

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 722 798

②1 N° d'enregistrement national :

94 09272

⑤1 Int Cl⁶ : C 12 P 7/64, A 01 H 5/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 25.07.94.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 26.01.96 Bulletin 96/04.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés : DIVISION DEMANDEE LE 01/08/94
BENEFICIAIRE DE LA DATE DE DEPOT DU
22/02/94 DE LA DEMANDE INITIALE N° 94 02006
(ARTICLE L.612-4) DU CODE DE LA PROPRIÉTÉ
INTELLECTUELLE

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE INPT ETABLIS
PUBLIC A CARACT SCIENT ET CULT — FR.

⑦2 Inventeur(s) : ALIBERT GILBERT, MOULOUNGUI
ZEPHIRIN et BOUDET ALAIN.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : BARRE LAFORGUE ET ASSOCIES.

⑤4 PROCÉDE DE PRODUCTION D'ACIDES GRAS OU DERIVES A PARTIR DE PLANTES OLEAGINEUSES.

⑤7 L'invention concerne un procédé de production d'acides gras ou de dérivés d'acides gras à partir de plantes oléagineuses. Ce procédé est caractérisé en ce qu'on produit des plantes oléagineuses transgéniques possédant, d'une part, au moins un gène codant pour une enzyme lipase, dit gène de lipase, d'autre part, associé à ce gène de lipase, un promoteur permettant une expression dudit gène soit dans des compartiments différents des compartiments d'accumulation des lipides, soit sur induction exogène, on recueille les graines ou fruits contenant les lipides des plantes, on les broie le cas échéant après traitement inducteur de façon à mettre en contact lipides et lipase, on laisse incuber l'ensemble pour engendrer une hydrolyse enzymatique des lipides et on extrait les acides gras ou dérivés.

FR 2 722 798 - A1



PROCEDE DE PRODUCTION D'ACIDES GRAS OU DERIVES
A PARTIR DE PLANTES OLEAGINEUSES

L'invention concerne un procédé de
5 production d'acides gras ou dérivés d'acides gras (sters
ou autres dérivés) à partir de plantes oléagineuses. Le
procédé de l'invention s'applique en particulier à des
plantes oléoprotéagineuses telles que colza, tournesol,
soja, crambé... L'invention peut notamment être utilisée
10 pour fabriquer des bio-carburants (diester), lubrifiants,
adjuvants phytosanitaires, détergents... par transformation
des acides gras produits.

On a tenté depuis 1970 de substituer aux
produits dérivés du pétrole (notamment carburants) des
15 produits obtenus à partir de matière végétale afin de
réduire la dépendance vis-à-vis des pays producteurs de
pétrole et d'élargir les débouchés des produits agricoles.
La filière utilisant les plantes oléagineuses comme matière
première passe par la production d'acides gras libres qui
20 constituent la matière première pour les industries de
transformation vers les carburants, lubrifiants... Les
lipides accumulés par les plantes oléagineuses peuvent être
transformés en acide gras par hydrolyse : deux procédés
sont actuellement exploités industriellement pour opérer
25 cette transformation.

Un premier procédé consiste à hydrolyser
les lipides après extraction en mettant en contact à chaud
et sous pression les lipides extraits avec du méthanol
sulfurique ou de la potasse méthanolique. Un autre procédé
30 consiste à opérer l'hydrolyse dans des conditions
similaires directement sur le broyat de graines sans
extraction préalable. On pourra par exemple se reporter à
la référence suivante pour plus de détails sur ces procédés
qui sont les seuls exploités dans l'industrie pour
35 hydrolyser les huiles végétales : K.J. Harrington et
C. d'Arcy-Evans, Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev. 1985, 24,
314-318. Les défauts bien connus de ces procédés sont les
suivants : coût de mise en oeuvre élevé, infrastructure

industrielle lourde, caractère polluant des effluents, production de glycérol comme sous-produit sans marché actuellement. Ces procédés sont mis en oeuvre faute de techniques de remplacement.

5 Par ailleurs, des expérimentations ont été conduites en laboratoire pour réaliser l'hydrolyse des lipides par voie enzymatique en mélangeant une lipase avec les lipides extraits des graines (G.P. McNeill et al., JAOCS, Vol. 68 n° 1 janvier 1991, p. 1-5 ; S.M. Kim et J.S. Rhee, JAOCS Vol. 68 n° 7 juillet 1991, p. 499-503 ; C. Gancet, In Heterogeneous Catalysis And Fine Chemicals II 1991, Guisnet Editors, p. 93-104). Toutefois, ces essais sont restés au stade du laboratoire car la technique est incompatible avec une exploitation industrielle en raison
10 des quantités d'enzyme nécessaires et du coût de celle-ci.
15

La présente invention se propose de fournir une nouvelle solution au problème de la production d'acide gras à partir de plantes oléagineuses. Elle vise à fournir une solution dont les coûts de mise en oeuvre sont
20 considérablement abaissés par rapport aux procédés connus (aussi bien procédés chimiques industriels que procédé enzymatique de laboratoire).

Un objectif de l'invention est ainsi de fournir un procédé exploitable sur le plan industriel dans
25 des conditions douces de température et de pression, qui bénéficie d'une mise en oeuvre simple et non polluante, utilise une infrastructure légère et ne conduit à aucun sous-produit gênant.

Un autre objectif, lié au précédent, est de
30 permettre de multiplier les installations de production d'acides gras en vue de les rapprocher des lieux de culture des plantes oléagineuses et de réaliser ainsi des économies de transport de la matière première.

A cet effet, le procédé conforme à
35 l'invention pour la production d'acides gras ou dérivés d'acides gras à partir de plantes oléagineuses se caractérise en ce que :

- on produit des plantes oléagineuses

transgéniques possédant, d'une part, au moins un gène codant pour une enzyme lipase, dit gène de lipase, d'autre part, associé à ce gène de lipase, un promoteur permettant une expression dudit gène soit dans des compartiments
5 cellulaires, extracellulaires ou tissulaires différents de ceux où s'accumulent les lipides de la plante, soit sur induction exogène,

- on recueille les graines ou fruits contenant les lipides desdites plantes,

10 - on broie lesdites graines ou fruits, le cas échéant après traitement inducteur, de façon à mettre en contact les lipides et la lipase contenue dans lesdites graines ou fruits,

- on laisse incuber l'ensemble pour engendrer une hydrolyse enzymatique des lipides du broyat
15 sous l'action catalytique de la lipase contenue dans ledit broyat,

- on extrait les acides gras issus de l'hydrolyse ou on les transforme pour obtenir les dérivés
20 d'acides gras recherchés.

Ainsi le procédé de l'invention est un procédé d'hydrolyse enzymatique qui bénéficie des avantages de ce type de procédé (conditions douces de mise en oeuvre, absence de pollution, installations légères et peu
25 coûteuses, absence de sous-produits gênants). Dans ce procédé, on amène la plante à produire elle-même l'enzyme nécessaire à la transformation ultérieure des lipides, en évitant que cette enzyme ne vienne prématurément au contact des lipides de façon à écarter tout risque d'auto-
30 dégradation de la plante avant la récolte. L'hydrolyse est ensuite obtenue sans addition d'enzyme exogène en opérant la mise en contact des lipides et des enzymes produits par la plante. Un tel procédé présente un coût global de mise en oeuvre particulièrement réduit. Les installations de
35 broyage et d'incubation sont légères et courantes dans le milieu agricole, de sorte que ces opérations peuvent être exécutées sur les sites de récolte des plantes.

La production des plantes transgéniques est

obtenue en réalisant initialement la transformation génétique d'une plante oléagineuse naturelle, en amenant la plante génétiquement transformée à se multiplier par la voie sexuée pour la production de semences transgéniques et
5 en utilisant ensuite ces semences pour l'obtention de plantes transgéniques descendantes.

La transformation génétique initiale consiste, selon un processus actuellement bien connu, à réaliser une cassette d'expression comprenant le gène de
10 lipase et le promoteur d'expression de ce gène et à introduire cette cassette d'expression dans le génome de la plante.

Une des caractéristiques essentielles du procédé de l'invention est que le promoteur associé au gène
15 de lipase est adapté pour éviter une mise en contact prématurée de l'enzyme et des lipides ; ce promoteur peut être de plusieurs types : il peut soit (1) diriger l'expression du gène dans des compartiments différents de ceux où s'accumulent les lipides, soit (2) initier
20 l'expression du gène au moment opportun par induction exogène.

Dans le premier cas, deux types de cassettes d'expression peuvent être utilisés :

(1A) soit une cassette d'expression
25 comprenant un gène de lipase et un promoteur contrôlant l'expression de ce gène dans un compartiment cellulaire ou tissulaire différent du compartiment d'accumulation des lipides,

(1B) soit une cassette d'expression
30 comprenant un promoteur constitutif et un gène de lipase muni d'une séquence d'adressage vers des compartiments cellulaires ou extracellulaires différents de ceux où s'accumulent les lipides.

Dans le second cas (2), le promoteur
35 utilisé dans la cassette d'expression est du type contrôlable de façon exogène par des signaux physiques, chimiques ou biochimiques, en particulier promoteur de stress commandant l'expression sur application d'un

traumatisme physique sur les graines ou fruits.

Par exemple pour produire des acides gras à partir de plantes oléoprotéagineuses, on peut utiliser le mode de mise en oeuvre 1A ci-dessus évoqué :

5 - la transformation génétique de la plante est effectuée en réalisant une cassette d'expression comprenant un gène de lipase et un promoteur contrôlant l'expression d'une protéine déterminée de la graine, et en introduisant cette cassette d'expression dans le génome de
10 la plante de façon à faire exprimer la lipase dans les compartiments de la graine où s'accumulent la protéine précitée,

 - la mise en contact des lipides et de la lipase est effectuée par simple broyage.

15 Pour le colza, le promoteur de la protéine utilisé est avantageusement le promoteur de la napine qui permet une accumulation massive de lipase dans les corps protéiques de la graine, séparés des globules lipidiques.

 Le mode de mise en oeuvre 1B ci-dessus peut
20 être utilisé quel que soit le type de plante oléagineuse, par exemple en choisissant le promoteur constitutif 35S du CaMV (Virus de la mosaïque du chou-fleur) et la séquence d'adressage PR-S du tabac afin de diriger l'excrétion des lipases produites vers les compartiments extracellulaires.
25 La mise en contact des lipides et des lipases est également effectuée dans ce cas par simple broyage.

 Le mode de mise en oeuvre (2) ci-dessus peut être utilisé quel que soit le type de plante oléagineuse, par exemple en choisissant le promoteur
30 inhibiteur de protéase isolé de la pomme de terre, qui commande l'expression des gènes en cas de blessures. Le traitement inducteur qui provoque la synthèse des lipases peut être dans ce cas une action de décorticage des graines, réalisée avant le broyage.

35 De préférence, quel que soit le mode de mise en oeuvre choisi, on utilise un gène codant pour une lipase non spécifique, c'est-à-dire caractérisée par une activité hydrolytique non spécifique, afin d'obtenir une

hydrolyse totale des lipides accumulés par la plante et d'éviter les réactions parasites de saponification. Il est toutefois possible, pour certaines utilisations des acides gras, de faire produire à la plante des lipases à activité
 5 hydrolytique spécifique afin de favoriser un type donné d'hydrolyse (par exemple : monoacylglycérolipase du *Penicillium camembertii* réalisant uniquement l'hydrolyse d'une des trois liaisons du glycérol avec les acides gras, en vue de la fabrication de diacylglycérols).

10 On peut en particulier utiliser des gènes de lipase non spécifique, caractérisé par les séquences suivantes ou par des séquences analogues aux séquences suivantes (les flèches délimitent la partie codante) :

SEQUENCE I

15 1 GATGACAACT TGGTTGGTGG CATGACTTTG GACTTACCCA GCGATGCTCC
 51 TCCTATCAGC CTCTCTAGCT CTACCAACAG CGCCTCTGAT GGTGGTAAGG
 101 TTGTTGCTGC TACTACTGCT CAGATCCAAG AGTTCACCAA GTATGCTGGT
 151 ATCGCTGCCA CTGCCTACTG TCGTTCTGTT GTCCCTGGTA ACAAGTGGGA
 201 TTGTGTCCAA TGTCAAAAGT GGGTTCCTGA TGGCAAGATC ATCACTACCT
 20 251 TTACCTCCTT GCTTTCCGAT ACAAATGGTT ACGTCTTGAG AAGTGATAAA
 301 CAAAAGACCA TTTATCTTGT TTTCCGTGGT ACCAACTCCT TCAGAAGTGC
 351 CATCACTGAT ATCGTCTTCA ACTTTTCTGA CTACAAGCCT GTCAAGGGCG
 401 CCAAAGTTCA TGCTGGTTTC CTTTCCTCTT ATGAGCAAGT TGTCAATGAC
 451 TATTTCCCTG TCGTCCAAGA ACAATTGACC GCCCACCCTA CTTATAAGGT
 25 501 CATCGTTACC GGTCCTCAC TCGGTGGTGC ACAAGCTTTG CTTGCCGGTA
 551 TGGATCTCTA CCAACGTGAA CCAAGATTGT CTCCCAAGAA TTTGAGCATC
 601 TTCCTGTCG GTGGTCCTCG TGTGGTAAC CCCACCTTTG CTTACTATGT
 651 TGAATCCACC GGTATCCCTT TCCAACGTAC CGTTCACAAG AGAGATATCG
 701 TTCCTCACGT TCCTCCTCAA TCCTTCGGAT TCCTTCATCC CGGTGTTGAA
 30 751 TCTTGGATGA AGTCTGGTAC TTCCAACGTT CAAATCTGTA CTTCTGAAAT
 801 TGAAACCAAG GATTGCAGTA ACTCTATCGT TCCTTTCACC TCTATCCTTG
 851 ACCACTTGAG TTACTTTGAT ATCAACGAAG GAAGCTGTTT GTAAAACACT
 901 TGACGTGTTA CTCTAATTTT ATAATAAAAT TAAGTTTTTA TACAAT

SEQUENCE II

1 GTCGACCATT TCAGCCTGTT TTGCTCGCAA AACGACGCCG CGGGCGTGCG
51 CTACCGCACA CTCGTCGCT GGGCGTTGTG CGGGGAAGAT TCAAACGAGC
5 101 GTTTCGGGCC GTAACAACCC GCTCTCTTCC GCTCTGCCAC GCAGGTTATG
151 ACCGGCCGCC AGGAAGCCGC GGATTTCTTG GCCTGGAGGA AAAAAGCCGA
201 AGCTGGCACG GTTCCTGGCG CAAGGGACAG CGAAGCGGTT CTCCCGGAAG
251 GATTTCGGCG ATGGCTGGCA GGACGCGCCC CTCGGCCCCA TCAACCTGAG
301 ATGAGAACAA CATGAAGAAG AAGTCTCTGC TCCCCCTCGG CCTGGCCATC
10 351 GGTCTCGCCT CTCTCGCTGC CAGCCCTCTG ATCCAGGCCA GCACCTACAC
401 CCAGACCAAA TACCCCATCG TGCTGGCCCA CGGCATGCTC GGCTTCGACA
451 ACATCCTCGG GGTGCACTAC TGGTTCGGCA TTCCAGCGC CTTGCGCCGT
501 GACGGTGCCC AGGTCTACGT CACCGAAGTC AGCCAGTTGG ACACCTCGGA
551 AGTCCGCGGC GAGCAGTTGC TGCAACAGGT GGAGGAAATC GTCGCCCTCA
15 601 GCGGCCAGCC CAAGGTCAAC CTGATCGGCC ACAGCCACGG CGGGCCGACC
651 ATCCGCTACG TCGCCGCCGT ACGTCCCGAC CTGATCGCTT CCGCCACCAG
701 CGTCGGCGCC CCGCACAAGG GTTCGGACAC CGCCGACTTC CTGCGCCAGA
751 TCCACCCGGG TTCGGCCGGC GAGGCAGTCC TCTCCGGGCT GGTCAACAGC
801 CTCGGCGCGC TGATCAGCTT CCTTTCCAGC GGCAGCACCG GTACGCAGAA
20 851 TTCACTGGGC TCGCTGGAGT CGCTGAACAG CGAGGGTGCC GCGCGCTTCA
901 ACGCCAAGTA CCCGCAGGGC ATCCCCACCT CGGCCTGCGG CGAAGGCGCC
951 TACAAGGTCA ACGGCGTGAG CTATTACTCC TGGAGCGGTT CCTCGCCGCT
1001 GACCAACTTC CTCGATCCGA GCGACGCCTT CCTCGGCGCC TCGTCGCTGA
1051 CCTTCAAGAA CGGCACCGCC AACGACGGCC TGGTCGGCAC CTGCAGTTCG
25 1101 CACCTGGGCA TGGTGATCCG CGACAACTAC CGGATGAACC ACCTGGACGA
1151 GGTGAACCAG GTCTTCGGCC TCACCAGCCT GTTCGAGACC AGCCCGGTCA
1201 GCGTCTACCG CCAGCACGCC AACCGCCTGA AGAACGCCAG CCTGTAG

SEQUENCE III

1 GGGTGCATGC CAGCTCCCAO CGGACACCTG GCCCGTCGCT GAAACGTGTT
51 TTCGCTTTCT CTACAAATCC AACAAACAGAG AGGCACTACC ATGGGTATCT
5 101 TTGACTATAA AAACCTTGGC ACCGAGGGTT CCAAAACGTT GTTCGCCGAT
151 GCCATGGCGA TCACGTTGTA TTCCTATCAC AACCTGGATA ACGGCTTTGC
201 CGTGGGCTAC CAGCACAACG GGTTGGGCTT GGGGCTACCG GCCACGCTGG
251 TCGGTGCGCT GCTCGGCAGC ACGGATTCCC AGGGCGTGAT CCCTGGCATC
301 CCGTGGAACC CGGATTGAGA AAAAGCCGCC CTTGAGGCGG TGCAGAAAGC
10 351 CGGTTGGACA CCGATCAGCG CCAGTGCCCT GGGCTACGCC GGCAAGGTCG
401 ATGCACGTGG CACCTTCTTT GGGGAAAAAG CCGGCTACAC CACGGCCCAG
451 GTCGAGGTAC TCGGCAAATA CGATGACGCC GGCAAGCTGC TCGAAATCGG
501 CATCGGTTTT CGTGGCACTT CGGGGCCACG GGAAACCTTG ATCAGCGACT
551 CGATCGGCGA CTTGATCAGC GATCTGCTCG CGGCCCTGGG GCCCAAGGAT
15 601 TACGCGAAAA ACTACGCCGG CGAAGCCTTC GGCGGCTTGC TCAAGAATGT
651 TGCCGACTAC GCCGGTGCCC ATGGCCTGAC CGGCAAGGAC GTGGTGGTCA
701 GCGGCCACAG CCTGGGCGGG CTGGCGGTCA ACAGCATGGC GGAATTGAGC
751 AACTACAAAT GGGCGGGGTT CTACAAGGAC GCCAACTATG TTGCCTATGC
801 CTCGCCGACC CAGAGTGCCG GCGACAAGGT GCTCAATATC GGTACGAAA
20 851 ACGACCCGGT GTTCCGCGCG CTGGACGGCT CGTCGTTTAA CCTGTCGTCG
901 CTGGGCGTGC ACGACAAACC CCACGAGTCC ACCACCGATA ACATCGTCAG
951 CTTCAACGAC CACTACGCCT CGACGCTGTG GAATGTGCTG CCGTTTTCCA
1001 TCGTCAACCT GCCACCTGG GTCTCGCATT TGCCGACGGC GTACGGCGAT
1051 GGCATGACGC GCATCCTCGA GTCCGGCTTC TACGACCAGA TGACCCGTGA
25 1101 CTCCACGGTG ATTGTTGCCA ACCTGTCCGA TCCGGCGCGG GCCAACACCT
1151 GGGTGCAGGA CCTCAACGCG AATGCCGAGC CCCACAAGGG CAACACGTTT
1201 ATCATCGGCA GCGACGGCAA CGACCTGATC CAGGGCGGCA ACGGTGCGGA
1251 CTTTATCGAG GGTGGCAAAG GCAACGACAC GATCCGCGAC AACAGCGGGC
1301 ACAACACCTT TTTGTTGAGC GGCCACTTTG GCAATGATCG CGTGATTGGC

1351 TACCAGCCCA CCGACAACT GGTGTTCAAG GACGTGCAAG GAAGCACCGA
 1401 CCTGCGTGAC CACGCGAAGG TGGTCGGCGC CGATACGGTG CTTACGTTTG
 1451 GGGCCGACTC GGTGACGCTG GTCGGCGTGG GGCATGGCGG GCTGTGGACG
 5 1501 GAGGGCGTGG TGATCGGCTG ATTACTCAGC CAACCGATCA GTGCCAGTGC
 1551 TGCCCCCGCC AGCCACCGCC CCAATTGGGC CGGTGGGGGT AGCCATAGCC

SEQUENCE IV

1 GGGCGATGGC TGGCAGGACG CGCCCCTCGG CCCCATCAAC CTGAGATGAG
 51 AACAAATGA AGAAGAAGTC TCTGCTCCCC CTCGGCCTGG CCATCGGCCT
 10 101 CGCCTCTCTC GCTGCCAGCC CTCTGATCCA GGCCAGCACC TACACCCAGA
 151 CCAAATACCC CATCGTGCTG GCCCACGGCA TGCTCGGCTT CGACAATATC
 201 CTCGGGGTCG ACTACTGGTT CGGCATTCCC AGCGCCTTGC GCCGTGACGG
 251 TGCCCAGGTC TACGTCACCG AAGTCAGCCA GTTGGACACC TCGGAAGTCC
 301 GCGGCGAGCA GTTGCTGCAA CAGGTGGAGG AAATCGTCGC CCTCAGCGGC
 15 351 CAGCCCAAGG TCAACCTGAT CGGCCACAGC CACGGCGGGC CGACCATCCG
 401 CTACGTGCCC GCGGTACGTC CCGACCTGAT GCCTTCGGCC ACCAGCGTCG
 451 GCGCCCCGCA CAAGGGTTCG GACACCGCCG ACTTCCTGCG CCAGATCCCA
 501 CCGGGTTCGG CCGGCGAGGC AGTCCTCTCC GGGCTGGTCA ACAGCCTCGG
 551 CGCGCTGATC AGCTTCCTTT CCAGCGGCAG CGCCGGTACG CAGAATTAC
 20 601 TGGGCTCGCT GGAGTCGCTG AACAGCGAGG GGGCCGCGCG CTTCAACGCC
 651 AAGTACCGC AGGGCATCCC CACCTCGGCC TGCGGCGAAG GCGCCTACAA
 701 GGTCAACGGC GTGAGCTATT ACTCCTGGAG CGGTTCTCG CCGCTGACCA
 751 ACTTCCTCGA TCCGAGCGAC GCCTTCCTCG GCGCCTCGTC GCTGACCTTC
 801 ~~AAGAACGGCA~~ CCGCCTACGA CGGCCTGGTC GGCACCTGCA GTTCGCACCT
 25 851 GGGCATGGTG ATCCGCGACA ACTACCGGAT GAACCACCTG GACGAGGTGA
 901 ACCAGGTCTT CGGCCTCACC AGCCTGTTTG AGACCAGCCC GGTCAGCGTC
 951 TACCGCCAGC ACGCCAACCG CCTGAAGAAC GCCAGCCTGT AGGACCCCGG
 1001 CCGGGGCCTC GGCCCCGGCC CTTTCCCGGA AGCCCCCTCG CGTGAAGAAA
 1051 ATCCTCCTGC TGATTCCACT GCGTTCGCG GCCAGCCTGG CCTGGTTCGT

SEQUENCE V

1 CAGGCCCCCA CCGCCGTTCT TAATGGCAAC GAGGTCACTCT CTGGTGTCTT
51 TGGGGGCAAG GTTGATACCT TTAAGGGAAT TCCATTGCT GACCCTCCTG
5 101 TTGGTGACTT GCGGTTCAAG CACCCCCAGC CTTTCACTGG ATCCTACCAG
151 GGTCTTAAGG CCAACGACTT CAGCTCTGCT TGTATGCAGC TTGATCCTGG
201 CAATGCCATT TCTTGGCTTG ACAAAGTCGT GGGCTTGGGA AAGATTCTTC
251 CTGATAACCT TAGAGGCCCT CTTTATGACA TGGCCCAGGG TAGTGTCTCC
301 ATGAATGAGG ACTGTCTCTA CCTTAACGTT TTCCGCCCTG CTGGCACCAA
10 351 GCCTGATGCT AAGCTCCCCG TCATGGTTTG GATTTACGGT GGTGCCTTTG
401 TGTITGGTTC TTCTGCTTCT TACCCTGGTA ACGGCTACGT CAAGGAGAGT
451 GTGGAAATGG GCCAGCCTGT TGTGTTTGT TCCATCAACT ACCGTACCGG
501 CCCCTATGGA TTCCTGGGTG GTGATGCCAT CACCGCTGAG GGTAACACCA
551 ACGCTGGTCT GCACGACCAG CGCAAGGGTC TCGAGTGGGT TAGCGACAAC
15 601 ATTGCCAACT TTGGTGGTGA TCCCGACAAG GTCATGATTT TCGGTGAGTC
651 CGCTGGTGCC ATGAGTGTTG CTCACCAGCT TGTTGCCTAC GGTGGTGACA
701 ACACCTACAA CGGAAAGAAG CTTTTCCACT CTGCCATTCT TCAGTCTGGC
751 GGTCTCTTTC CTTACTTTGA CTCTACTTCT GTTGGTCCCG AGAGTGCCTA
801 CAGCAGATTT GCTCAGTATG CCGGATGTGA TGCCAGCGCC AGTGACAATG
20 851 AACTCTGGC TTGTCTCCGC AGCAAGTCCA GCGATGTCTT GCACAGTGCC
901 CAGAACTCGT ACGATCTCAA GGACCTGTTT GGCCTGCTCC CTCAATTCT
951 TGGATTTGGT CCCAGACCCG ACGGCAACAT TATTCCCGAT GCCGCTTATG
1001 AGCTCTACCG CAGCGGTAGA TACGCCAAGG TTCCCTACAT TACTGGTAAC
1051 CAGGAGGATG AGGGTACTAT TCTTGCCCCC GTTGCTATTA ATGCTACCAC
25 1101 GACTCCCCAT GTTAAGAAGT GGTGGAAGTA CATTTGTAGC GAGGCTTCTG
1151 ACGCTTCGCT TGATCGTGTT TTGTCGCTCT ACCCCGGCTC TTGGTCGGAG
1201 GGTGCGCCAT TCCGCACTGG TATTCTTAAT GCTCTGACCC CTCAGTTCAA
1251 GCGCATTGCT GCCATTTTCA CTGATTTGCT GTTCCAGTCT CCTCGTCGTG
1301 TTATGCTTAA CGCTACCAAG GACGTCAACC GCTGGACTTA CCTTGCCACC

1351 CAGCTCCATA ACCTCGTTCC ATTTTGGGT ACTTTCCATG GTAGTGATCT
 1401 TCTTTTCCAA TACTACGTGG ACCTTGGCCC ATCTTCTGCT TACCGCCGCT
 1451 ACTTTATCTC GTTTGCCAAC CACCACGACC CCAACGTTGG CACCAACCTG
 5 1501 AACAGTGGG ATATGTACAC TGATGCAGGC AAGGAGATGC TTCAGATTCA
 1551 TATGGTTGGT AACTCTATGA GAACTGACGA CTTTAGAATC GAGGGAATCT
 1601 CGAACTTTGA GTCTGACGTT ACTCTCTTCG GTTAA

SEQUENCE VI

1 ATGGAGCTCG CTCTTGCGCT CCTGCTCATT GCCTCGGTGG CTGCTGCCCC
 10 51 CACCGCCACG CTCGCCAACG GCGACACCAT CACCGGTCTC AACGCCATCA
 101 TCAACGAGGC GTTCCTCGGC ATTCCCTTTG CCGAGCCGCC GGTGGGCAAC
 151 CTCCGCTTCA AGGACCCCGT GCCGTA CTCC GGCTCGCTCG ATGGCCAGAA
 201 GTTCACGCTG TACGGCCCGC TGTGCATGCA GCAGAACCCC GAGGGCACCT
 251 ACGAGGAGAA CCTCCCCAAG GCAGCGCTCG ACTTGGTGAT GCAGTCCAAG
 15 301 GTGTTTGAGG CGGTGCTGCC GCTGAGCGAG GACTGTCTCA CCATCAACGT
 351 GGTGCGGCCG CCGGGCACCA AGGCGGGTGC CAACCTCCCG GTGATGCTCT
 401 GGATCTTTGG CGGCGGGTTT GAGGTGGGTG GCACCAGCAC CTTCCCTCCC
 451 GCCCAGATGA TCACCAAGAG CATTGCCATG GGCAAGCCCA TCATCCACGT
 501 GAGCGTCAAC TACCGCGTGT CGTCGTGGGG GTTCTTGGCT GGCGACGAGA
 20 551 TCAAGGCCGA GGGCAGTGCC AACGCCGTT TGAAGGACCA GCGCTTGGGC
 601 ATGCAGTGGG TGGCGGACAA CATTGCGGCG TTTGGCGGCG ACCCGACCAA
 651 GGTGACCATC TTTGGCGAGC TGGCGGGCAG CATGTCGGTC ATGTGCCACA
 701 TTCTCTGGAA CGACGGCGAC AACACGTACA AGGGCAAGCC GCTCTTCCGC
 751 GCGGGCATCA TGCAGCTGGG GGCCATGGTG CCGCTGGACG CCGTGGACGG
 25 801 CATCTACGGC AACGAGATCT TTGACCTCTT GGCGTCGAAC GCGGGCTGCG
 851 GCAGCGCCAG CGACAAGCTT GCGTGCTTGC GCGGTGTGCT GAGCGACACG
 901 TTGGAGGACG CCACCAACAA CACCCCTGGG TTCTTGGCGT ACTCCTCGTT

951 GCGGTTGCTG TACCTCCCCC GGCCCGACGG CGTGAACATC ACCGACGACA
1001 TGTACGCCTT GGTGCGCGAG GGCAAGTATG CCAACATCCC TGTGATCATC
1051 GCGGACCAGA ACGACGAGGG CACCTTCTTT GGCACCCTGC TGTTGAACGT
5 1101 GACCACGGAT GCCCAGGCCC GCGAGTACTT CAAGCAGCTG TTTGTCCACG
1151 CCAGCGACGC GGAGATCGAC ACGTTGATGA CGGCGTACCC CGGCGACATC
1201 ACCCAGGGCC TGCCGTTCGA CACGGGTATT CTCAACGCCC TCACCCCGCA
1251 GTTCAAGAGA ATCCTGGCGG TGCTCGGCGA CCTTGGCTTT ACGCTTGCTC
1301 GTCGCTACTT CCTCAACCAC TACACCGGCG GCACCAAGTA CTCATTCCCTC
10 1351 CTGAAGCAGC TCCTGGGCTT GCCGGTGCTC GGAACGTTCC ACTCCAACGA
1401 CATTGTCTTC CAGGACTACT TGTGCGGAG CGGCTCGCTC ATCTACAACA
1451 ACGCGTTCAT TCGTTTTGCC ACGGACTTGG ACCCCAACAC CGCGGGGTTG
1501 TTGGTGAAGT GGCCCGAGTA CACCAGCAGC CTGCAGCTGG GCAACAACCT
1551 GATGATGATC AACGCCTTGG GCTTGTACAC CGGCAAGGAC AACTTCCGCA
15 1601 CCGCCGGCTA CGACGCGTTG TTCTCCAACC CGCCGCTGTT CTTTGTGTAA

La séquence I correspond à un cDNA de *Rhizopus niveus*, la séquence II peut être isolée à partir du génome de *Pseudomonas aeruginosa*, la séquence III à partir de *Pseudomonas fluorescens*, la séquence IV à partir de *Pseudomonas sp*, la séquence V à partir de *Geotrichum candidum*, la séquence VI à partir de *Candida cylindracea*.

Par ailleurs, l'introduction de la cassette d'expression : gène de lipase/promoteur d'expression de ce gène, dans le génome de la plante oléagineuse peut être réalisée par tout protocole connu.

Par exemple, selon le protocole le plus courant actuellement, cette cassette d'expression peut être introduite dans le génome de cellules somatiques de la plante par un transfert à l'aide de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Cette introduction dans lesdites cellules somatiques de la plante peut également être réalisée par une autre technique connue, notamment par électroporation, par biolistique ou par microinjection.

Il est également possible d'introduire la cassette d'expression dans le génome de microspores de la plante par électroporation ou biolistique.

Dans le protocole fourni plus loin à titre d'exemple, on a décrit la technique d'électroporation pour l'introduction de la cassette dans les microspores du colza.

On pourra se reporter au document suivant "P.J.J. Hooykaas et R.A. Schilperoort, TIBS août 1985, p. 305-309" pour plus de détail sur la technique de transfert à l'aide de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. On rappelle que cette technique consiste à introduire la cassette d'expression concernée dans le plasmide Ti de la bactérie notamment par choc thermique, puis à mettre en contact la bactérie avec des disques de feuilles de la plante, à laisser incubé l'ensemble jusqu'à obtenir le transfert de la cassette d'expression dans le génome des cellules des disques foliaires, et à cultiver ces disques foliaires sur une succession de milieux jusqu'à régénération des plantes transgéniques.

On pourra se reporter au document suivant "J.A. Russell et al., In Vitro Cell. Dev. Biol., 1992, 28P, p. 97-105" pour plus de détail sur la technique de biolistique. On rappelle que cette technique consiste à
5 fixer le plasmide contenant la cassette d'expression sur des microbilles d'or ou de tungstène, à projeter ces microbilles à l'aide d'un canon à particules sur les cellules de la plante à transformer, et à cultiver ces cellules jusqu'à régénération des plantes transgéniques.

10 On pourra se reporter au document suivant "Crossway A et Al, 1986, Mol. Gen. Genet 202, 179-185" pour plus de détail sur la technique de micro-injection. On rappelle que cette technique consiste à injecter dans des protoplastes ou de très jeunes embryons le plasmide
15 contenant la cassette d'expression à l'aide de micro-seringues, et à cultiver les protoplastes jusqu'à régénération des plantes transgéniques.

Après mise au contact par broyage de la lipase et des lipides, on laisse incuber l'ensemble pour
20 réaliser l'hydrolyse enzymatique. Cette incubation est réalisée dans des conditions classiques, en particulier entre 20° C et 60° C, pendant le temps nécessaire à l'obtention d'une hydrolyse totale ou quasi-totale.

L'extraction des acides gras issus de
25 l'hydrolyse est ensuite opérée par tout procédé connu, en particulier par une extraction liquide/liquide utilisant un solvant apolaire tel que le chloroforme ou l'hexane.

Selon un autre mode de mise en oeuvre, il est possible de réaliser in situ une transformation des
30 acides gras pour obtenir des dérivés d'acides gras qui sont ensuite extraits. Par exemple, les acides gras issus de l'hydrolyse peuvent être méthylés in situ par mise en contact avec du méthanol en catalyse acide sous ultrasons en vue de les transformer en esters méthyliques, ces
35 derniers étant extraits par une extraction liquide/liquide utilisant un solvant apolaire.

La présente demande vise, en tant que produit nouveau, toute plante oléagineuse ou semenc de

plante oléagineuse, d'une variété non protégeable par un certificat d'obtention végétale, qui comprend dans son génome une cassette d'expression possédant au moins un gène codant pour une enzyme lipase, associé à un promoteur permettant une expression dudit gène dans des compartiments cellulaires, extracellulaires ou tissulaires différents des compartiments lipidiques de la plante ou de la semence.

Le promoteur associé au gène de lipase peut être un promoteur à expression cellulaire ou tissulaire spécifique. Ce promoteur peut également être un promoteur constitutif, auquel cas le gène de lipase est muni d'une séquence d'adressage vers des compartiments cellulaires ou extracellulaires différents des compartiments d'accumulation des lipides.

La présente demande vise également toute plante oléagineuse ou semence de plante oléagineuse, d'une variété non protégeable par un certificat d'obtention végétale, qui comprend dans son génome une cassette d'expression possédant au moins un gène codant pour une enzyme lipase, associé à un promoteur permettant une expression dudit gène sur induction exogène, en particulier par un stress.

La description qui suit en référence au dessin fournit à titre d'exemple un protocole de mise en oeuvre du procédé de l'invention ; la figure 1 du dessin schématise la préparation du matériel génétique à transférer.

1/ PROTOCOLE D'OBTENTION DE PLANTES TRANSGENIQUES DE COLZA EXPRIMANT UN GENE DE LIPASE

a) Matériel végétal

On utilise des graines de colza (*Brassica napus*, Var Tapidor) qui sont obtenues dans le commerce.

Les graines sont semées en serre et cultivées dans des conditions standard. L'état sanitaire des plantes est rigoureusement surveillé.

Les jeunes bourgeons (taille inférieure à 3,5 mm) sont prélevés, stérilisés dans l'hypochlorite de

sodium pendant 30 minutes et les microspores sont extraites des anthères par broyage au Waring Blendor dans 1 milieu de Huang et al (Huang et al. 1990, Plant. Cell. Rep. 8, 594-597). Après filtration sur un tamis métallique de 50 µm
5 de vide de maille, les microspores sont récupérées par centrifugation 5 minutes à 100xg (Protocole décrit dans : Jardinaud et al., 1993, Plant. Sci. 93, 177-184).

b) Construction génétique

La construction génétique retenue met en
10 oeuvre le promoteur de la napine, le cDNA de la lipase de *Rhizopus niveus* et le terminateur NOS. Le promoteur de la napine dirige l'expression de cette protéine dans un compartiment protéique de la graine différent de celui où s'accumulent les lipides. L'ensemble est introduit dans le
15 plasmide pRT1 contenant le gène de sélection *pat* utilisé pour cribler les transformants en vue de former la construction pRT1L.

Le détail de la construction est donné à la figure 1 du dessin.

20 Le promoteur napine désigné "Prom. Nap" a été isolé par l'équipe du Professeur Rask (Stalberg K. et al, 1993, Plant Molecular Biology, 23 : 671-683). Le cDNA de la lipase de *Rhizopus niveus*, désigné "Lip", a été isolé par le Central Research Institute (Kugimiya et al., 1992,
25 Biosci. Biotech. Biochem. 56, 716-719). Un codon d'initiation, désigné "start codon", compatible avec l'extrémité 5' du cDNA (disponible sur le marché) est greffé sur cette extrémité. Sur l'extrémité 3' de l'ensemble obtenu, désigné "lip", on greffe un terminateur
30 désigné NOS extrait du plasmide pRT1 ci-après évoqué et, sur l'extrémité 5', le promoteur Nap.

La cassette d'expression ainsi obtenue est introduite dans un plasmide désigné "Blue-Script" (nom commercial) en vue d'en réaliser l'amplification.

35 La cassette d'expression amplifiée est ensuite extraite de "Blue-Script" et introduite dans un plasmide désigné pRT1 qui a été préparé en greffant le promoteur désigné CaMV35S sur l'extrémité 5' du gène "pat"

codant pour la phosphinothricine acétyl transférase (gène de sélection) et le terminateur NOS sur l'extrémité 3'.

On obtient un plasmide désigné pRT1L contenant la cassette d'expression visée.

5 c) Transfert de gène et production des plantes transgéniques

Les microspores isolées en a) (10^6 microspores ml^{-1}) sont mises en suspension dans le milieu de Brewbaker et Kwack (J.L. Brewbaker et B.H. Kwack, 10 1963, Am. J. Bot. 50, p. 859-865) contenant 13 % de saccharose et ajusté à pH 5,9. 50 μg par ml du plasmide pRT1L sont ajoutés au milieu et des impulsions électriques de 400 V/cm pendant 10 ms sont appliquées à la suspension à l'aide d'un électroporateur "Jouan" (marque 15 déposée) (TRX, GHT) délivrant des impulsions en vague carrée. Après 20 minutes de repos, le milieu de culture (Huang et al.) contenant 100 mg/l de phosphinothricine est ajouté aux microspores. Les microspores sont cultivées à l'obscurité 24 h à 35° C puis à 25° C. Après 2 semaines de 20 culture un volume égal de milieu neuf est ajouté et les microspores placées à la lumière sous photopériode 16 h jour / 8 h obscurité.

Après environ 1 mois les embryons sont transférés en milieu B₅ (Gamborg et al., 1979, Exp. Cell. 25 Res. 50, 151-158) contenant G3A₃ 1 ml/g, 20g/l saccharose et solidifié par 8/1 de gélifiant "Bacto Agar" (marque déposée).

Les plantes régénérées résistantes à la phosphinothricine sont analysées en "southern" de façon à 30 vérifier la présence dans leur génome de la séquence codant pour la lipase. Le stock chromosomique des plantes retenues est doublé par la colchicine (0,1 g/l plus quelques gouttes de teepol) et les plantes diploïdes fertiles produites sont autofécondées.

35 Sur un nombre restreint de graines, on recherche l'activité de la lipase. Les plantes présentant des graines dont l'activité lipase est la plus élevée sont retenues et les graines utilisées pour la multiplication

des plantes jusqu'à obtention d'un stock de graines suffisant pour réaliser les expériences d'hydrolyse des lipides de la graine par les lipases endogènes.

5 2/ HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES LIPIDES DES GRAINES DE COLZA
OBTENUES

Les graines sont broyées, le broyat placé dans un incubateur maintenu à la température constante de 40°. Le broyat est soumis à une agitation permanente de façon à augmenter le contact entre les lipides et la lipase.

Après 48 h d'hydrolyse, les acides gras sont extraits par le chloroforme. Le chloroforme est évaporé et les acides gras récupérés.

REVENDEICATIONS

1/ - Procédé de production d'acides gras ou de dérivés d'acides gras à partir de plantes oléagineuses, caractérisé en ce que :

- 5 - on produit des plantes oléagineuses transgéniques possédant, d'une part, au moins un gène codant pour une enzyme lipase, dit gène de lipase, d'autre part, associé à ce gène de lipase, un promoteur permettant une expression dudit gène soit dans des compartiments
- 10 cellulaires, extracellulaires ou tissulaires différents de ceux où s'accumulent les lipides de la plante, soit sur induction exogène,
- on recueille les graines ou fruits contenant les lipides desdites plantes,
- 15 - on broie ledites graines ou fruits, le cas échéant après traitement inducteur, de façon à mettre en contact les lipides et la lipase contenue dans lesdites graines ou fruits,
- on laisse incuber l'ensemble pour
- 20 engendrer une hydrolyse enzymatique des lipides du broyat sous l'action catalytique de la lipase contenue dans ledit broyat,
- on extrait les acides gras issus de l'hydrolyse ou on les transforme pour obtenir les dérivés
- 25 d'acides gras recherchés.

2/ - Procédé selon la revendication 1, dans lequel on produit les plantes transgéniques en effectuant une transformation génétique d'une plante oléagineuse naturelle, en amenant la plante génétiquement transformée à

30 se multiplier par la voie sexuée pour la production de semences transgéniques et en utilisant lesdites semences pour l'obtention de plantes transgéniques descendantes.

3/ - Procédé selon la revendication 2 pour la production d'acides gras à partir de plantes

35 oléoprotéagineuses, caractérisé en ce que :

- la transformation génétique de la plante est effectuée en réalisant une cassette d'expression comprenant un gène de lipase et un promoteur contrôlant

l'expression d'une protéine déterminée de la graine, t en introduisant cette cassette d'expression dans le génome de la plante de façon à faire exprimer la lipase dans les compartiments de la graine où s'accumulent la protéine
5 précitée,

- la mise en contact des lipides et de la lipase est effectuée par simple broyage.

4/ - Procédé selon la revendication 3 pour la production d'acides gras à partir de colza, caractérisé
10 en ce que la transformation génétique est effectuée à partir d'une cassette d'expression comprenant un gène de lipase et le promoteur de la napine.

5/ - Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que :

15 . la transformation génétique de la plante est effectuée en réalisant une cassette d'expression comprenant un gène de lipase et un promoteur contrôlable de façon exogène, et en introduisant cette cassette d'expression dans le génome de la plante,

20 . un traitement inducteur est appliqué aux graines et fruits avant broyage de façon à provoquer la synthèse de la lipase.

6/ - Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que :

25 . la transformation génétique est effectuée à partir d'une cassette d'expression comprenant un gène de lipase et un promoteur de stress,

30 . le traitement inducteur est constitué par un traumatisme physique appliqué sur les graines ou fruits avant le broyage.

7/ - Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que :

35 . la transformation génétique de la plante est effectuée en réalisant une cassette d'expression comprenant un promoteur constitutif et un gène de lipase muni d'une séquence d'adressage vers des compartiments cellulaires ou extracellulaires différents de ceux où s'accumulent les lipides,

. la mise en contact des lipides et de la lipase est effectuée par simple broyage.

8/ - Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'on produit des plantes transgéniques possédant un gène de lipase caractérisée par une activité hydrolytique non spécifique.

9/ - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'on produit des plantes transgéniques possédant un gène de lipase caractérisé par une séquence identique ou analogue à l'une des séquences suivantes (les flèches délimitent la partie codante) :

SEQUENCE I

```

1  GATGACAAC TGGTTGGTGG CATGACTTTG GACTTACCCA GCGATGCTCC
51 TCCTATCAGC CTCTCTAGCT CTACCAACAG CGCCTCTGAT GGTGGTAAGG
101 TTGTTGCTGC TACTACTGCT CAGATCCAAG AGTTCACCAA GTATGCTGGT
151 ATCGCTGCCA CTGCCTACTG TCGTTCTGTT GTCCCTGGTA ACAAGTGGGA
201 TTGTGTCCAA TGTCAAAAGT GGGTTCCTGA TGGCAAGATC ATCACTACCT
251 TTACCTCCTT GCTTTCGAT ACAAATGGTT ACGTCTTGAG AAGTGATAAA
301 CAAAAGACCA TTTATCTTGT TTTCCGTGGT ACCAACTCCT TCAGAAGTGC
351 CATCACTGAT ATCGTCTTCA ACTTTTCTGA CTACAAGCCT GTCAAGGGCG
401 CCAAAGTTCA TGCTGGTTTC CTTTCCTCTT ATGAGCAAGT TGTCAATGAC
451 TATTTCCCTG TCGTCCAAGA ACAATTGACC GCCCACCCTA CTTATAAGGT
501 CATCGTTACC GGTCACCTAC TCGGTGGTGC ACAAGCTTTG CTTGCCGGTA
551 TGGATCTCTA CCAACGTGAA CCAAGATTGT CTCCAAGAA TTTGAGCATC
601 TTCCTGTCTG GTGGTCCTCG TGTTGGTAAC CCCACCTTTG CTTACTATGT
651 TGAATCCACC GGTATCCCTT TCCAACGTAC CGTTCACAAG AGAGATATCG
701 TTCCTCACGT TCCTCCTCAA TCCTTCGGAT TCCTTCATCC CGGTGTTGAA
751 TCTTGGATGA AGTCTGGTAC TTCCAACGTT CAAATCTGTA CTTCTGAAAT
801 TGAAACCAAG GATTGCAGTA ACTCTATCGT TCCTTTCACC TCTATCCTTG
851 ACCACTTGAG TTACTTTGAT ATCAACGAAG GAAGCTGTTT GTAAAACACT
901 TGACGTGTTA CTCTAATTTT ATAATAAAAT TAAGTTTTTA TACAAT

```


SEQUENCE 11

1 GTCGACCATTT TCAGGCTGTT TTGCTGGCAA AACGACGCCG CGGGCGTGCG
51 CTACCGCACA CTCGTCGCT GGGGTTGTG CGGGGAAGAT TCAAACGAGC
5 101 GTTTCGCGCC GTAACAACC GCTCTCTTCC GCTCTGCCAC GCAGGTTATG
151 ACCGGCCGCC AGGAAGCCGC GGATTTCTG GCCTGGAGGA AAAAAGCCGA
201 AGCTGGCACG GTTCCTGGCG CAAGGGACAG CGAAGCGGTT CTCCCGGAAG
251 GATTCGGGCG ATGGCTGGCA GGACGCGCCC CTCGGCCCCA TCAACCTGAG
301 ATGAGAACAA CATGAAGAAG AAGTCTCTGC TCCCCCTCGG CCTGGCCATC
10 351 GGTCTCGCCT CTCTCGCTGC CAGCCCTCTG ATCCAGGCCA GCACCTACAC
401 CCAGACCAA TACCCCATCG TGCTGGCCCA CGGCATGCTC GGCTTCGACA
451 ACATCCTCGG GGTGACTAC TGGTTCGGCA TTCCAGCGC CTTGCGCCGT
501 GACGGTGCCC AGGTCTACGT CACCGAAGTC AGCCAGTTGG ACACCTCGGA
551 AGTCCGCGGC GAGCAGTTGC TGCAACAGGT GGAGGAAATC GTCGCCCTCA
15 601 GCGGCCAGCC CAAGGTCAAC CTGATCGGCC ACAGCCACGG CGGGCCGACC
651 ATCCGCTACG TCGCCGCGT ACGTCCCGAC CTGATCGCTT CCGCCACCAG
701 CGTCGGCGCC CCGCACAAGG GTTCGGACAC CGCCGACTTC CTGCGCCAGA
751 TCCACCGGG TTCGGCCGGC GAGGCAGTCC TCTCCGGGCT GGTCAACAGC
801 CTCGGCGCGC TGATCAGCTT CCTTTCCAGC GGCAGCACCG GTACGCAGAA
20 851 TTCACTGGGC TCGCTGGAGT CGCTGAACAG CGAGGGTGCC GCGCGCTTCA
901 ACGCCAAGTA CCCGCAGGGC ATCCCCACCT CGGCCTGCGG CGAAGGCGCC
951 TACAAGGTCA ACGGCGTGAG CTATTACTCC TGGAGCGGTT CCTCGCCGCT
1001 GACCAACTTC CTCGATCCGA GCGACGCCTT CCTCGGCGCC TCGTCGCTGA
1051 COTTCAAGAA CGGCACCGCC AACGACGGCC TGGTCGGCAC CTGCAGTTCC
25 1101 CACCTGGGCA TGGTGATCCG CGACAACCTAC CGGATGAACC ACCTGGACGA
1151 GGTGAACCAG GTCTTCGGCC TCACCAGCCT GTTCGAGACC AGCCCGGTCA
1201 GCGTCTACCG CCAGCACGCC AACCGCCTGA AGAACGCCAG CCTGTAG

SEQUENCE III

1 GGTGGCATAC CAGGTCCAC CGGACACCTG GCCGTCGCT GAAACGTGT
 51 TTGGCTTTCT CTACAAATCC AACACAGAG AGGCACTACC **V**ATGGGTATCT
 5 101 TTGACTATAA AACCTTGGC ACGGAGGGTT CCAAAACGTT GTTCGCCGAT
 151 GCCATGGCGA TCACGTTGTA TTCTATCAC AACCTGGATA ACGGCTTTGC
 201 CGTGGGCTAC CAGCACAACG GGTGGGCTT GGGGCTACCG GCCACGCTGG
 251 TCGGTGGGCT GCTCGGCAGC ACGGATTCCC AGGGCGTGAT CCCTGGCATC
 301 CCGTGGAACC CGGATTCAGA AAAAGCCGCC CTTGAGGCGG TGCAGAAAGC
 10 351 CGGTTGGACA CCGATCAGCG CCAGTGCCCT GGGCTACGCC GGCAAGGTCTG
 401 ATGCACGTGG CACCTTCTTT GGGGAAAAG CCGGCTACAC CACGGCCCAG
 451 GTCGAGGTAC TCGGCAAATA CGATGACGCC GGCAAGCTGC TCGAAATCGG
 501 CATCGGTTTT CGTGGCACTT CGGGGCCACG GGAAACCTTG ATCAGCGACT
 551 CGATCGGCGA CTTGATCAGC GATCTGCTCG CGGCCCTGGG GCCCAAGGAT
 15 601 TACGCGAAAA ACTACGCCGG CGAAGCCTTC GGCGGCTTGC TCAAGAATGT
 651 TGCCGACTAC GCCGGTGCCC ATGGCCTGAC CGGCAAGGAC GTGGTGGTCA
 701 GCGGCCACAG CCTGGGCGGG CTGGCGGTCA ACAGCATGGC GGA~~CT~~TGAGC
 751 AACTACAAAT GGGCGGGGTT CTACAAGGAC GCCAACTATG TTGCCTATGC
 801 CTCGCCGACC CAGAGTGCCG GCGACAAGGT GCTCAATATC GGTTACGAAA
 20 851 ACGACCCGGT GTTCGCGCG CTGGACGGCT CGTCGTTTAA CCTGTCGTCG
 901 CTGGGCGTGC ACGACAAACC CCACGAGTCC ACCACCGATA ACATCGTCAG
 951 CTTCAACGAC CACTACGCCT CGACGCTGTG GAATGTGCTG CCGTTTTCCA
 1001 TCGTCAACCT GCCACCTGG GTCTCGCATT TGCCGACGGC GTACGGCGAT
 1051 GGCATGACGC GCATCCTCGA GTCCGGCTTC TACGACCAGA TGACCCGTGA
 25 1101 CTCCACGGTG ATTGTTGCCA ACCTGTCCGA TCCGGCGCGG GCCAACACCT
 1151 GGGTGCAGGA CCTCAACCGC AATGCCGAGC CCCACAAGGG CAACACGTTC
 1201 ATCATCGGCA GCGACGGCAA CGACCTGATC CAGGGCGGCA ACGGTGCGGA
 1251 CTTTATCGAG GGTGGCAAAG GCAACGACAC GATCCGCGAC AACAGCGGGC
 1301 ACAACACCTT TTTGTTGAGC GGCCACTTTG GCAATGATCG CGTGATTGGC

1351 TACCAGCCCA CCGACAAACT GGTGTTCAAG GACGTGCAAG GAAGCACCGA
 1401 CCTGCGTGAC CACGCGAAGG TGGTCGGCGC CGATACGGTG CTTACGTTTG
 1451 GGGCCGACTC GGTGACGCTG GTCGGCGTGG GGCATGGCGG GCTGTGGACG
 5 1501 GAGGGCGTGG TGATCGGCTG ATTACTCACG CAACCGATCA GTGCCAGTGC
 1551 TGCCCCCGCC AGCCACCGCC CCAATTGGGC CGGTGGGGGT AGCCATAGCC

SEQUENCE IV

1 GGGCGATGGC TGGCAGGACG CGCCCTCGG CCCCATCAAC CTGAGATGAG
 51 AACAAATGA AGAAGAAGTC TGTGCTCCCC CTCGGCCTGG CCATCGGCCT
 10 101 CGCCTCTCTC GCTGCCAGCC CTCTGATCCA GGCCAGCACC TACACCCAGA
 151 CCAAATACCC CATCGTGCTG GCCCACGGCA TGCTCGGCTT CGACAATATC
 201 CTCGGGGTCC ACTACTGGTT CGGCATTCCC AGCGCCTTGC GCCGTGACGG
 251 TGCCCAGGTC TACGTCACCG AAGTCAGCCA GTTGGACACC TCGGAAGTCC
 301 GCGGCGAGCA GTTGCTGCAA CAGGTGGAGG AAATCGTCGC CCTCAGCGGC
 15 351 CAGCCCAAGG TCAACCTGAT CGGCCACAGC CACGGCGGGC CGACCATCCG
 401 CTACGTCGCC GCCGTACGTC CCGACCTGAT GCCTTCCGCC ACCAGCGTCG
 451 GCGCCCCGCA CAAGGGTTCG GACACCGCCG ACTTCCTGCG CCAGATCCCA
 501 CCGGGTTCGG CCGGCGAGGC AGTCCTCTCC GGGCTGGTCA ACAGCCTCGG
 551 CGCGCTGATC AGCTTCCTTT CCAGCGGCAG CGCCGGTACG CAGAATTCAC
 20 601 TGGGCTCGCT GGAGTCGCTG AACAGCGAGG GGGCCGCGCG CTTCAACGCC
 651 AAGTACCCGC AGGGCATCCC CACCTCGGCC TGCGGCGAAG GCGCCTACAA
 701 GGTCAACGGC GTGAGCTATT ACTCCTGGAG CGGTTCTCG CCGCTGACCA
 751 ACTTCCTCGA TCCGAGCGAC GCCTTCCTCG GCGCCTCGTC GCTGACCTTC
 801 AAGAACGGCA CCGCCAACGA CGGCCTGGTC GGCACCTGCA GTTCGCACCT
 25 851 GGGCATGGTG ATCCGCGACA ACTACCGGAT GAACCACCTG GACGAGGTGA
 901 ACCAGGTCTT CGGCCTCACC AGCCTGTTCC AGACCAGCCC GGTGAGCGTC
 951 TACCGCCAGC ACGCCAACCG CCTGAAGAAC GCCAGCCTGT AGGACCCCGG
 1001 CCGGGGCCTC GGCCCCGGCC CTTTCCCGGA AGCCCCCTCG CGTGAAGAAA
 1051 ATCCTCCTGC TGATTCCACT GGCCTTCGCC GCCAGCCTGG CCTGGTTCGT

SEQUENCE V

1 CAGGCCCCCA CGGCCGTTCT TAATGGCAAC GAGGTCATCT CTGGTGTCTT
51 TGGGGGCAAG GTTGATACCT TTAAGGGAAT TCCATTTGCT GACCCTCCTG
5 101 TTGGTGACTT GCGGTTCAAG CACCCCCAGC CTTTCACTGG ATCCTACCAG
151 GGTCTTAAGG CCAACGACTT CAGCTCTGCT TGTATGCAGC TTGATCCTGG
201 CAATGCCATT TCTTGGCTTG ACAAAGTCGT GGGCTTGGGA AAGATTCTTC
251 CTGATAACCT TAGAGGCCCT CTTTATGACA TGGCCCAGGG TAGTGTCTCC
301 ATGAATGAGG ACTGTCTCTA CCTTAACGTT TTCCGCCCTG CTGGCACCAA
10 351 GCCTGATGCT AAGCTCCCCG TCATGGTTTG GATTTACGGT GGTGCCTTTG
401 TGTTTGGTTC TTCTGCTTCT TACCCTGGTA ACGGCTACGT CAAGGAGAGT
451 GTGGAAATGG GCCAGCCTGT TGTGTTTGTT TCCATCAACT ACCGTACCGG
501 CCCCTATGGA TTCCTGGGTG GTGATGCCAT CACCGCTGAG GGTAAACACCA
551 ACGCTGGTCT GCACGACCAG CGCAAGGGTC TCGAGTGGGT TAGCGACAAC
15 601 ATTGCCAACT TTGGTGGTGA TCCCGACAAG GTCATGATTT TCGGTGAGTC
651 CGCTGGTGCC ATGAGTGTTG CTCACCAGCT TGTTGCCTAC GGTGGTGACA
701 ACACCTACAA CGGAAAGAAG CTTTTCCACT CTGCCATTCT TCAGTCTGGC
751 GGTCTCTTTC CTTACTTTGA CTCTACTTCT GTTGGTCCCG AGAGTGCCTA
801 CAGCAGATTT GCTCAGTATG CCGGATGTGA TGCCAGCGCC AGTGACAATG
20 851 AAACCTCTGGC TTGTCTCCGC AGCAAGTCCA GCGATGTCTT GCACAGTGCC
901 CAGAACTCGT ACGATCTCAA GGACCTGTTT GGCCTGCTCC CTCAATTCTT
951 TGGATTTGGT CCCAGACCCG ACGGCAACAT TATTCCCGAT GCCGCTTATG
1001 AGCTCTACCG CAGCGGTAGA TACGCCAAGG TTCCCTACAT TACTGGTAAC
1051 CAGGAGGATG AGGGTACTAT TCTTGCCCCC GTTGCTATTA ATGCTACCAC
25 1101 GACTCCCCAT GTTAAGAAGT GGTTGAAGTA CATTTGTAGC GAGGCTTCTG
1151 ACGCTTCGCT TGATCGTGTT TTGTCGCTCT ACCCCGGCTC TTGGTCGGAG
1201 GGTGCGCCAT TCCGCACTGG TATTCTTAAT GCTCTGACCC CTCAGTTCAA
1251 GCGCATTGCT GCCATTTTCA CTGATTTGCT GTTCCAGTCT CCTCGTCGTG
1301 TTATGCTTAA CGCTACCAAG GACGTCAACC GCTGGACTTA CCTTGCCACC

1351 CAGCTCCATA ACCTCGTTCC ATTTTGGGT ACTTTCCATG GTAGTGATCT
 1401 TCTTTTCCAA TACTACGTGG ACCTTGGCCC ATCTTCTGCT TACCGCCGCT
 1451 ACTTTATCTC GTTTGCCAAC CACCACGACC CCAACGTTGG CACCAACCTG
 5 1501 AAACAGTGGG ATATGTACAC TGATGCAGGC AAGGAGATGC TTCAGATTCA
 1551 TATGGTTGGT AACTCTATGA GAACTGACGA CTTTAGAATC GAGGGAATCT
 1601 CGAACTTTGA GTCTGACGTT ACTCTCTTCG GTTAA

SEQUENCE VI

1 ATGGAGCTCG CTCTTGCGCT CCTGCTCATT GCCTCGGTGG CTGCTGCCCC
 10 51 CACCGCCACG CTGCGCAACG GCGACACCAT CACCGGTCTC AACGCCATCA
 101 TCAACGAGGC GTTCCTCGGC ATTCCCTTTG CCGAGCCGCC GGTGGGCAAC
 151 CTCCGCTTCA AGGACCCCGT GCCGTACTCC GGCTCGCTCG ATGGCCAGAA
 201 GTTCACGCTG TACGGCCCGC TGTGCATGCA GCAGAACCCC GAGGGCACCT
 251 ACGAGGAGAA CCTCCCCAAG GCAGCGCTCG ACTTGGTGAT GCAGTCCAAG
 15 301 GTGTTTGAGG CGGTGCTGCC GCTGAGCGAG GACTGTCTCA CCATCAACGT
 351 GGTGCGGCCG CCGGGCACCA AGGCGGGTGC CAACCTCCCG GTGATGCTCT
 401 GGATCTTTGG CGGCGGGTTT GAGGTGGGTG GCACCAGCAC CTTCCCTCCC
 451 GCCCAGATGA TCACCAAGAG CATTGCCATG GGCAAGCCCA TCATCCACGT
 501 GAGCGTCAAC TACCGCGTGT CGTCGTGGGG GTTCTTGGCT GGCAGCAGAA
 20 551 TCAAGGCCGA GGGCAGTGCC AACGCCGGTT TGAAGGACCA GCGCTTGGGC
 601 ATGCAGTGGG TGGCGGACAA CATTGCGGCG TTTGGCGGCG ACCCGACCAA
 651 GGTGACCATC TTTGGCGAGC TGGCGGGCAG CATGTCGGTC ATGTGCCACA
 701 TTCTCTGGAA CGACGGCGAC AACACGTACA AGGGCAAGCC GCTCTTCCGC
 751 GCGGGCATCA TGCAGCTGGG GGCCATGGTG CCGCTGGACG CCGTGGACGG
 25 801 CATCTACGGC AACGAGATCT TTGACCTCTT GCGTCTGAAC GCGGGCTGCG
 851 GCAGCGCCAG CGACAAGCTT GCGTGCTTGC GCGGTGTGCT GAGCGACACG
 901 TTGGAGGACG CCACCAACAA CACCCCTGGG TTCTTGGCGT ACTCCTCGTT

951 GCGGTTGCTG TACCTCCCCC GGCCCGACGG CGTGAACATC ACCGACGACA
1001 TGTACGCCTT GGTGCGCGAG GGCAAGTATG CCAACATCCC TGTGATCATC
1051 GGCGACCAGA ACGACGAGGG CACCTTCTTT GGCACCCTGC TGTGTAACGT
5 1101 GACCACGGAT GCCCAGGCCC GCGAGTACTT CAAGCAGCTG TTTGTCCACG
1151 CCAGCGACGC GGAGATCGAC ACGTTGATGA CGGCGTACCC CGGCGACATC
1201 ACCCAGGGCC TGCCGTTCTGA CACGGGTATT CTCAACGCCC TCACCCCGCA
1251 GTTCAAGAGA ATCCTGGCGG TGCTCGGCGA CCTTGGCTTT ACGCTTGCTC
1301 GTCGCTACTT CCTCAACCAC TACACCGGCG GCACCAAGTA CTCATTCTC
10 1351 CTGAAGCAGC TCCTGGGCTT GCCGGTGCTC GGAACGTTCC ACTCCAACGA
1401 CATTGTCTTC CAGGACTACT TGTTGGGCAG CGGCTCGCTC ATCTACAACA
1451 ACGCGTTCAT TGCGTTTGCC ACGGACTTGG ACCCCAACAC CGCGGGGTTG
1501 TTGGTGAAGT GGCCCGAGTA CACCAGCAGC CTGCAGCTGG GCAACAACCT
1551 GATGATGATC AACGCCTTGG GCTTGTACAC CGGCAAGGAC AACTTCCGCA
15 1601 CCGCCGGCTA CGACGCGTTG TTCTCCAACC CGCCGCTGTT CTTTGTGTAA

10/ - Procédé selon la revendication 2, dans lequel la transformation génétique de la plante est effectuée en réalisant une cassette d'expression comprenant le gène de lipase et le promoteur associé, et n
5 introduisant cette cassette d'expression dans le génome de cellules somatiques de la plante par un transfert à l'aide de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, ou par électroporation, ou par biolistique, ou par microinjection.

11/ - Procédé selon la revendication 2, dans lequel la transformation génétique de la plante est effectuée en réalisant une cassette d'expression comprenant le gène de lipase et le promoteur associé, et en
10 introduisant cette cassette d'expression dans le génome de microspores de la plante par électroporation ou biolistique.

12/ - Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, dans lequel l'incubation pour engendrer l'hydrolyse enzymatique est réalisée à une température comprise entre 20° C et 60° C.

20 13/ - Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, dans lequel l'extraction des acides gras issus de l'hydrolyse est réalisée par une extraction liquide/liquide utilisant un solvant apolaire.

25 14/ - Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, dans lequel les acides gras issus de l'hydrolyse sont méthylés in situ par mise en contact avec du méthanol en catalyse acide sous ultrasons en vue de les transformer en esters méthyliques, ces derniers étant extraits par une extraction liquide/liquide utilisant un
30 solvant apolaire.

15/ - Plante oléagineuse ou semence de plante oléagineuse, d'une variété non protégeable par un certificat d'obtention végétale, caractérisée en ce qu'elle comprend dans son génome une cassette d'expression
35 possédant au moins un gène codant pour une enzyme lipase, associé à un promoteur permettant une expression dudit gène dans des compartiments cellulaires, extracellulaires ou tissulaires différents des compartiments lipidiques de la

plante ou de la semence.

- 16/ - Plante ou semence selon la revendication 15, dans laquelle le promoteur associé au gène de lipase est un promoteur à expression cellulaire ou tissulaire spécifique.

- 17/ - Plante ou semence selon la revendication 15, dans laquelle le gène de lipase est muni d'une séquence d'adressage vers des compartiments cellulaires ou extracellulaires différents des compartiments d'accumulation des lipides, le promoteur étant un promoteur constitutif.

- 18/ - Plante oléagineuse ou semence de plante oléagineuse, d'une variété non protégeable par un certificat d'obtention végétale, caractérisée en ce qu'elle comprend dans son génome une cassette d'expression possédant au moins un gène codant pour une enzyme lipase, associé à un promoteur permettant une expression dudit gène sur induction exogène, en particulier par un stress.

1/1

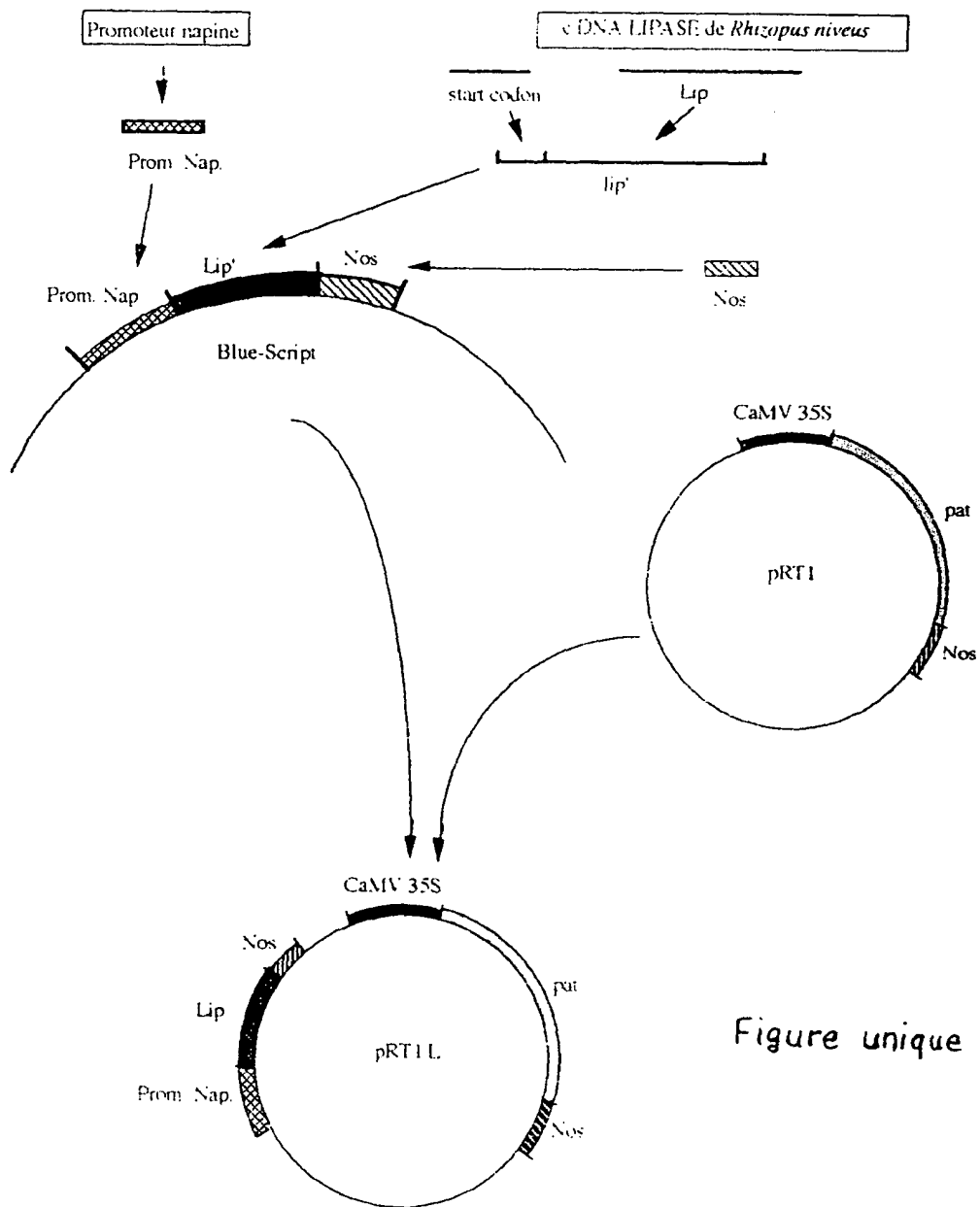


Figure unique

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'assignation
national

FA 502602
FR 9409272

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	WO-A-92 05249 (NOVONORDISK AS) 2 Avril 1992 * le document en entier * ---	1-18	
A	EP-A-0 449 376 (GIST BROCADES NV ; MOGEN INT (NL)) 2 Octobre 1991 * le document en entier * ---	1-18	
A	WO-A-91 06661 (ENZYTECH INC) 16 Mai 1991 * le document en entier * ---	1-18	
A	WO-A-92 01042 (NOVO NORDISK) 23 Janvier 1992 * page 1, ligne 8 - ligne 21; revendications 14,35 * * page 7, ligne 4 - ligne 16 * ---	1-18	
A	EP-A-0 427 309 (UNILEVER NV ; UNILEVER PLC (GB)) 15 Mai 1991 * le document en entier * -----	1-18	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL. 6)
			C12N C12P A01H
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur	
31 Mars 1995		Maddox, A	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

1

EPO FORM 1503 (01.92) (P04C13)

Print Selection

[Help](#)[Clear](#)[Cancel](#)[Print](#)

Select?	Patent	Section	Page	Database
<input checked="" type="checkbox"/>	US5697986A	all	all	DWPI
<input checked="" type="checkbox"/>	FR2722798A	all	all	DWPI
<input checked="" type="checkbox"/>	DE19622601C	all	all	DWPI

Building**Room****Printer**

cp3



4c07



gbloptr

[Main Menu](#)[Logout](#)

Search Results - Record(s) 1 through 4 of 4 returned.

- ☐ 1. Document ID: DE 19622601 C1
 L29: Entry 1 of 4 File: DWPI Mar 12, 1998

DERWENT-ACC-NO: 1998-146168
 DERWENT-WEEK: 199814
 COPYRIGHT 2000 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Biofuel used in diesel engines - based on fatty acid (ester) with nitrogen-containing additive

Full	Title	Citation	Front	Review	Classification	Date	Reference	Claims	KWIC	Draw Desc	Image
------	-------	----------	-------	--------	----------------	------	-----------	--------	------	-----------	-------

- ☐ 2. Document ID: US 5713965 A
 L29: Entry 2 of 4 File: DWPI Feb 3, 1998

DERWENT-ACC-NO: 1998-129762
 DERWENT-WEEK: 199812
 COPYRIGHT 2000 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Production of alkyl ester(s) useful as biofuel(s) and lubricant(s) - comprises dissolving tri:glyceride or free fatty acid=containing material in organic solvent and then incubating with mixture of alcohol and lipase to achieve (trans)esterification

Full	Title	Citation	Front	Review	Classification	Date	Reference	Claims	KWIC	Draw Desc	Image
------	-------	----------	-------	--------	----------------	------	-----------	--------	------	-----------	-------

- ☒ 3. Document ID: US 5697986 A
 L29: Entry 3 of 4 File: DWPI Dec 16, 1997

DERWENT-ACC-NO: 1998-051363
 DERWENT-WEEK: 199805
 COPYRIGHT 2000 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Bio-fuel production - by incubating reaction mixture comprising automotive or related fuel, fatty acid-containing substances, alcohol, lipase and water and separating by=products

Full	Title	Citation	Front	Review	Classification	Date	Reference	Claims	KWIC	Draw Desc	Image
------	-------	----------	-------	--------	----------------	------	-----------	--------	------	-----------	-------

- ☐ 4. Document ID: US 5942659 A, FR 2722798 A1, WO 9603511 A2, AU 9529849 A, WO 9603511 A3, EP 770134 A1
 L29: Entry 4 of 4 File: DWPI Aug 24, 1999

DERWENT-ACC-NO: 1996-107680
DERWENT-WEEK: 199941
COPYRIGHT 2000 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Prodn. of fatty acids or derivs. from transgenic oilseed plants -
engineered to express a lipase that contacts lipid(s) only when seeds are
milled

Full	Title	Citation	Front	Review	Classification	Date	Reference	Claims	FORMC	Draw. Desc	Image
------	-------	----------	-------	--------	----------------	------	-----------	--------	-------	------------	-------

Generate Collection

Terms	Documents
l17 and biofuel	4

Display

10

Documents, starting with Document:

4

Display Format:

TI

Change Format

Search Results - Record(s) 1 through 1 of 1 returned.☒ 1. Document ID: US 5713965 A

L27: Entry 1 of 1

File: DWPI

Feb 3, 1998

DERWENT-ACC-NO: 1998-129762

DERWENT-WEEK: 199812

COPYRIGHT 2000 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Production of alkyl ester(s) useful as biofuel(s) and lubricant(s) - comprises dissolving tri:glyceride or free fatty acid-containing material in organic solvent and then incubating with mixture of alcohol and lipase to achieve (trans)esterification

Full	Title	CIT.1	REV.1	CLS.1	REF.1	DRAW.1

Terms	Documents
l16 and biofuel	1

Documents, starting with Document:

Display Format:

Print Request Result(s)

Printer Name: gbloptr
Printer Location: cp3__4c07

- WO200005327A: At least one of the requested patents was not found
- JP363112536A: At least one of the requested patents was not found
- JP002538753B2: At least one of the requested patents was not found
- JP409157684A: Ok

OK

Back to List

Logout



Generate Collection

L29: Entry 1 of 4

File: DWPI

Mar 12, 1998

DERWENT-ACC-NO: 1998-146168
DERWENT-WEEK: 199814
COPYRIGHT 2000 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Biofuel used in diesel engines - based on fatty acid (ester) with
nitrogen-containing additive

INVENTOR: HAUPT, J; RADIG, W

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE
LUT LABOR & UMWELTECHNIK JENA GMBH

CODE
LUTLN

PRIORITY-DATA:

1996DE-1022601

June 5, 1996

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
DE 19622601 C1	March 12, 1998	N/A	007	C10L001/02

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	APPL-DESCRIPTOR
DE19622601C1	June 5, 1996	1996DE-1022601	N/A

INT-CL (IPC): C10L 1/02; C10L 1/22

ABSTRACTED-PUB-NO: DE19622601C

BASIC-ABSTRACT:

Biofuel is based on fatty acid and fatty acid ester mixtures, in which the sum of the free and bound glycerin component is 0.5-5% and the amount of free fatty acid is expressed by the OH number of at least 120 mg KOH/g. The water content is not more than 0.5%. The fuel also contains a basic, N-containing additive in the form of NH₃ or primary or secondary 1-20 C alkylamine or 2-8C aminoalcohol in amounts of 5-60 mol.%. Production of the biofuel is also claimed.

USE - Used for operating diesel engines.

ADVANTAGE - Deposits and corrosion are reduced.

ABSTRACTED-PUB-NO: DE19622601C

EQUIVALENT-ABSTRACTS:

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/1

DERWENT-CLASS: E16 E17 H06

CPI-CODES: E10-B03B; E10-B04D; E10-E04G; E10-E04J; H06-B04;

DEUTSCHLAND

DE 196 22 601 C 1



DEUTSCHES
PATENTAMT

- (21) Aktenzeichen: 196 22 601.5-44
 (22) Anmeldetag: 5. 6. 96
 (43) Offenlegungstag: —
 (45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: 12. 3. 98

C 10 L 1/02

C 10 L 1/22

// C 07D 213/06,

227/02, C 11B 13/00,

C 07C 69/30

DE 196 22 601 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

(73) Patentinhaber:

L.U.T. Labor- und Umwelttechnik Jena GmbH, 07745
Jena, DE

(72) Erfinder:

Haupt, Jens, Dr., 07745 Jena, DE; Radig, Wolfram,
Dr., 99518 Bad Sulza, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

FR 25 60 210 A1
 ULLMANN: Encyclopädia of Industrial Chemistry, 5.
 Aufl., VCH, 1990, Vol. A16, S. 745;

(54) Biokraftstoff und Verfahren zu seiner Herstellung

(57) Die Erfindung betrifft einen biobasierten Kraftstoff aus
fettartigen Vorprodukten.

Das Ziel der Erfindung besteht darin, die bekannten Mängel
biogener Kraftstoffe zu überwinden und einen Weg zur
effektiven Erzeugung neuartiger Kraftstoffe aufzuzeigen.

Es ist die Aufgabe der Erfindung, einen Biokraftstoff, der für
den Dieselmotorenbetrieb in motorischen Blockheizkraft-
werken (BHKW) geeignet ist, und ein rationelles Verfahren
zu dessen Herstellung zu entwickeln. Aufgrund des bekann-
ten Schädigungsmechanismus biogener Kraftstoffe stellt
sich die Erfindung insbesondere die Aufgabe, eine Kraft-
stoffkomposition zu erzeugen, die nur eine unterkritische
Menge freies oder chemisch gebundenes Glycerin aufweist
sowie mit korrosionsinhibierenden und stabilisierenden Ad-
ditiven versehen ist.

Als Ausgangssubstanz zur Herstellung derartiger Kraftstoffe
sind Fettsäureabscheiderinhalte sehr gut geeignet. Nachteilig ist
jedoch der hohe Wassergehalt dieser Stoffe, der im techni-
schen Einsatz auf Gehalte < 0,5% herabgesetzt werden
muß. Diese Aufgabe wird gelöst, indem in einem kontinuier-
lichen Verfahren die Abscheiderfette unter definierten Be-
dingungen nach einer mechanischen Vorbehandlung unter
Verwendung von Adsorbentien und Demulgatoren einer
Emulsionsspaltung und einer sich anschließenden Phasen-
trennung unterzogen werden. Durch Dotierung des auf diese
Weise erzeugten Fettsäure/Fettsäureestergemisches mit
stickstofffunktionalisierten Verbindungen wird anschließend
dem durch Restwasseranteile ...

DE 196 22 601 C 1

Die Erfindung betrifft einen biobasierten, zum Betreiben modifizierter Dieselmotoren geeigneten Kraftstoff, dessen Zusammensetzung durch eine Komposition aus Fettsäuren, Fettsäurepartial- und -triglyceriden und stickstofffunktionalisierten Additiven charakterisiert ist. Die Erfindung betrifft darüber hinaus ein Verfahren zur rationellen und umweltfreundlichen Herstellung dieses Kraftstoffes auf der Grundlage von fetthaltigen Abscheiderinhalten kommunaler und industrieller Abwasserbehandlungsanlagen.

Neben der Nutzung mineralischer Kohlenwasserstoffgemische als Otto- und Dieselmotorenkraftstoffe sind auch Kraftstoffkompositionen aus Mineralölprodukten und vorzugsweise sauerstofffunktionalisierten Verbindungen wie Alkoholen, Ketonen, Estern oder Ethern bekannt geworden (DE 31 16 734, DE 31 22 243, DE 31 50 988). Im Zusammenhang mit der zunehmenden Hinwendung zu nachwachsenden Rohstoffen ist in den letzten Jahren der Einsatz von Pflanzenölen oder deren Umesterungsprodukte bzw. Mischungen von Mineralölkraftstoffen mit solchen Produkten in den Mittelpunkt des Interesses gerückt (Herstellung: Ullmann, Enzyklopädie der technischen Chemie, 4. Aufl., Bd. 11 [1976], S. 432). Dabei gibt es einerseits Trends, die Dieselmotorentechnologie als "Vielstoffmotoren" den Ölen anzupassen (siehe auch Hoeck, R.; Widmann, B., VDI-Berichte, Band 1126 (1994) Düsseldorf: VDI-Verlag, Seite 231–238) oder andererseits die Pflanzenöle nach chemischer Modifizierung als Kraftstoffe in herkömmlichen Dieselmotoren (siehe auch Connemann, J., Fett Wissenschaft Technologie, Band 96 (1994) Heft Sonderausgabe 2, Seite 536–548) einzusetzen. Neben umweltpolitischen Vorteilen weisen beide Wege aber auch meist seltener erwähnte Nachteile auf, die gegenwärtig den umfassenden Einsatz nachwachsender Rohstoffe behindern.

Die Verwendung von reinen Pflanzenölen als Kraftstoff ist nur als Verschnittkomponente oder in entsprechend modifizierten Motoren möglich, da aufgrund des Glycerin- und Wasseranteils irreversible Schädigungen und letztlich der Totalausfall herkömmlicher Motoren die Folge ist (Korte, V.; Hemmerlein, N., Abschlußbericht TV 8837 im Auftrag des BMFT und in Abstimmung mit dem BML, Weissach, April 1991).

Die Umesterung der Pflanzenöle und in Europa vorzugsweise des Rapsöls führt zu einem, inzwischen von allen Motorenherstellern akzeptierten und zugelassenen Dieselmotorkraftstoffsubstitut, für das die Vornorm DIN V 51 606 geschaffen wurde. Hohe Kosten für die Ölproduktion- und -aufarbeitung sowie die Aufwendungen für die sich anschließende Umesterung und der Zwangsanfall von verunreinigtem Glycerin drängen diese Vorgehensweise aber an den Rand der Wirtschaftlichkeit. Dieser Nachteil wird gegenwärtig durch Flächenstilllegungssubventionen teilweise kompensiert.

Eine zusätzliche Problematik ergibt sich beim Einsatz derartiger Biokraftstoffe in motorischen Blockheizkraftwerken (Kraft-Wärme-Kopplung). Der Einsatzstoff steht hierbei trotz gesetzlich geschaffener Rahmenbedingungen stets im unmittelbaren Wettbewerb mit steuerbegünstigten Mineralölen.

Die Erschließung anderer biogener Rohstoffquellen für den Kraftstoffsektor und die Entwicklung entsprechend kostengünstiger und umweltfreundlicher Veredlungsverfahren sind deshalb weiter von wirtschaftlichem und umweltpolitischem Interesse. Das Ziel der Erfindung besteht darin, die bekannten Mängel biogener Kraftstoffe zu überwinden und einen Weg zur effektiver Erzeugung neuartiger Kraftstoffe aufzuzeigen.

Es ist die Aufgabe der Erfindung, einen Biokraftstoff, der für den Dieselmotorenbetrieb in motorischen Blockheizkraftwerken geeignet ist, und ein rationelles Verfahren zu dessen Herstellung zu entwickeln. Aufgrund des mit dem Stand von Forschung und Technik bekannten Schädigungsmechanismus biogener Kraftstoffe stellt sich die Erfindung insbesondere die Aufgabe, eine Kraftstoffkomposition zu erzeugen, die nur eine unterkritische Menge freies oder chemisch gebundenes Glycerin aufweist sowie mit korrosionsinhibierenden und stabilisierenden Additiven versehen ist. In der Kombination dieser Wirkungen wird insbesondere einem vorzeitigen Motorverschleiß durch Verminderung von Ablagerungen und Korrosion entgegengewirkt. Gleichzeitig bleiben die ökologische Vorteile biogener Kraftstoffe wie niedrige Emissionswerte und der geschlossene CO₂-Kreislauf erhalten.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß Gemische aus Fettsäuren sowie geringen Mengen an Mono-, Di- und Triglyceriden nach Additivierung die geforderten Eigenschaften im Hinblick auf die motorische Verwertung aufweisen.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird dadurch gelöst, daß Gemische von Fettsäuren sowie geringen Mengen an Mono-, Di- und Triglyceriden nach einer geeigneten Vorbehandlung mit einem Additiv ausgerüstet werden. Da bekannt ist, daß freies und chemisch gebundenes Glycerin die Hauptursache für die Motorschädigung durch Ablagerung darstellt, dürfen nur geringe Mengen von Partial- oder Triglyceriden vorhanden sein. Umgekehrt soll mit Hilfe insbesondere der Tensidwirkung der Monoglyceride die ungewollte Ausscheidung von Wasser aus dem Kraftstoff verhindert werden. Zur Komplettierung des Wirkungsfeldes ist die Verminderung der Konzentration aktiver Wasserstoffionen erforderlich. Dies wird erfindungsgemäß durch die Zugabe eines stickstofffunktionalisierten Additivs mit Basenwirkung erreicht.

Ein auf vorgenannte Wirkungen abgestimmter Kraftstoff hat nachfolgende Zusammensetzung: Die Summe des freien und gebundenen Glycerinanteils beträgt zwischen 0,5% und 5%, vorzugsweise jedoch von 0,7% bis 3%. Der Anteil der freien Fettsäure, ausgedrückt durch die Neutralisationszahl (NZ) beträgt mindestens 120 mg KOH/g, vorzugsweise jedoch mindestens 150 mg KOH/g. Das stickstofffunktionalisierte Additiv wird zu einem Anteil zwischen 5 Mol% (Berechnungsbasis: molare Stoffmenge Stickstoff gegenüber der molaren Stoffmenge der freien Carboxylgruppen) und maximal 60 Mol% zugegeben. Auf diese Weise wird eine minimale Wasserstoffionenkonzentration eingestellt und die Korrosionswirkung des Restwassers inhibiert.

Es wurde festgestellt, daß als Ausgangssubstanz zur Herstellung derartiger Kraftstoffe Fettabscheiderinhalte sehr gut geeignet sind: Durch biologische Degradation weisen diese Stoffe im Gegensatz zu anderen Altfetten nur noch einen geringen Anteil an freiem bzw. gebundenem Glycerin auf. Nachteilig ist jedoch der hohe Wassergehalt dieser Stoffe, der im technischen Einsatz auf Gehalte < 0,5% herabgesetzt werden muß. Diese

Aufgabe wird gelöst, indem in einem kontinuierlichen Verfahren die Abscheiderfette unter definierten Bedingungen nach einer mechanischen Vorbehandlung unter Verwendung von Adsorbentien und Demulgatoren einer Emulsionsspaltung und einer sich anschließender Phasentrennung unterzogen werden. Durch Dotierung des auf diese Weise erzeugte Fettsäure/Fettsäureestergemisches mit stickstofffunktionalisierten Verbindungen wird anschließend dem durch Restwasseranteile in Gegenwart von Carboxylfunktionen zu erwartenden Korrosionspotential entgegen gewirkt. 5

Der Prozeß wird im Temperaturbereich oberhalb von 50° C unter Normaldruck betrieben.

Anhand des in Fig. 1 dargestellten schematischen Prozeßverlaufs soll das erfindungsgemäße Verfahren näher erläutert werden. Dabei bleiben die Annahme und Einlagerung des Rohstoffes sowie die zur Produktspeicherung notwendigen Anlagenmodule unberücksichtigt. 10

Die stark verschmutzten Abscheiderinhalte 1, bestehend aus bis zu 80% Wasser und mechanischen Verunreinigungen (u. a. Holz, Textilreste, Kunststoffabfallreste, Schlamm, Sand) werden aus einem temperierten Vorratsbehälter als Oberphase abgezogen und einer mechanischen Vorbehandlung 12 mittels Siebung unterzogen. Dabei kommt es zur Abtrennung von festen Bestandteilen 5 bis zu einem Partikeldurchmesser von 1 mm. Durch den im als Mischer oder Rührkessel ausgelegten Apparat 13 erfolgenden Zusatz von die Spaltung der Fett-Wasser-Emulsion begünstigendem Demulgator 2 und gegebenenfalls Adsorbens 3 läßt sich das Rohprodukt in eine Schmutz/Wasser-Fraktion 7 und die angereicherte Fettsäure/ Fettsäureesterfraktion zerlegen. Bezogen auf den Wassergehalt des Rohproduktes werden 0,1 bis 40%, bevorzugt aber 30% Demulgator in fester oder flüssiger Form zugesetzt. Hier sind Schwefelsäure, Sulfate und Chloride der Metalle Na, K, Mg, Al oder Fe sowie deren Hydrate, insbesondere aber $Al_2(SO_4)_3 \cdot 16 H_2O$ geeignet. Im Falle extrem geruchsbelasteter und farblich beeinträchtigter Rohprodukte kann der Einsatz von bis zu 15% Adsorbens erfolgen. Anwendbar sind oberflächenreiche Substanzen wie Aktivkohlen und Kieselgele, vorzugsweise jedoch Bleicherden. Dabei wird im Bereich von 60° C bis 90° C unter 10 bis 15minütiger intensiver Durchmischung gearbeitet. Anschließend wird eine Absitzzeit von 2–10 Minuten eingehalten. In dem als Sieb oder Filter ausgelegten Modul 16 erfolgt die Trennung der separierten Unterphase in Feststoff 8 und Abwasser 9. Diese Vorbehandlung ermöglicht die sich anschließende Zerlegung des Gemisches in seine Fraktionen und insbesondere die Erzeugung einer nahezu vollkommen entwässerten Fettphase mit Hilfe eines nach dem Zentrifugenprinzip arbeitenden Trennapparates 14, wobei der Einsatz von Zentrifugen, Separatoren oder Dekantern, insbesondere aber Dreiphasendekantern vorteilhaft ist. Es wurde festgestellt, daß für die zu bearbeitenden Stoffgemische eine Betriebsweise des Dreiphasendekanters mit Trommeldrehzahlen von 2000 bis 4000 min^{-1} , vorzugsweise jedoch von 2700 min^{-1} bis 3300 min^{-1} , Differenzdrehzahlen von 20 bis 80 min^{-1} , insbesondere aber von 30 bis 50 min^{-1} und eine Arbeitstemperatur von 60 bis 65° C zu einer hohen Trennleistung führt. Das abgetrennte Restwasser 11 und das ausgetragene Sediment 10 werden dem Abwasser bzw. dem Feststoffabfall zugeführt. Im Apparat 15 erfolgt bei Temperaturen von 45° C bis 85° C, vorzugsweise jedoch von 50° C bis 65° C die Zumischung der korrosionsinhibierenden Additivkomponente 4. Hierzu sind sowohl Ammoniak, primäre und sekundäre Alkylamine als auch Aminoalkohole, insbesondere aber Ethylamin geeignet. 35

Die erhaltenen Fettsäure/Fettsäureestergemische 5 weisen Wassergehalte $\leq 0,3\%$ auf. Der Fettsäureesteranteil liegt in glyceridischer Form als Fettsäuretri- und Partialglycerid vor. Je nach Provenienz des Rohproduktes werden gebundene Glycerinanteile von 0,5 bis 5% eingestellt. Dieser Wert liegt damit in einem für biogene Dieselkraftstoffsubstitute günstigen und für den Betrieb herkömmlicher Dieselmotoren tolerierbaren Bereich. 40

Die abgetrennte Feststofffraktion wird nach Separation ungeeigneter Komponenten vorzugsweise der Kompostierung zugeführt, während das separierte Wasser einer vollbiologischen Abwasserbehandlung unterzogen wird.

Eine besonders vorteilhafte Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Parallelschaltung zweier Rührkessel zur Realisierung eines quasikontinuierlichen Betriebes in der Adsorptions- und Demulgierstufe 13. 45

Der erfindungsgemäße Biotreibstoff und das Verfahren zu seiner Herstellung wird nachstehend anhand von Ausführungsbeispielen weiter erläutert.

1. Ausführungsbeispiel 50

Ausgegangen wird von einem fett- bzw. fettsäurehaltigen Produkt aus der Skimmerabscheidung einer kommunalen Kläranlage. Der Einsatzstoff weist folgende Charakteristika auf: 55

60

65

Parameter	Meßwert	Maßeinheit
Toluolunlöslicher Rückstand	22,1	%
Wassergehalt	50,8	%
Neutralisationszahl des toluolunlöslichen Rückstandes	175	mg KOH/g
Iodzahl des toluollöslichen Rückstandes	55	g Iod/g
Gehalt an freiem und gebundenem Glycerin	1,07	%

Aus einem auf 60°C beheizten 30 m³-Tank wird mit einem Massenstrom von 1,7 t/h mittels einer Dickstoffpumpe über ein Saugrohr die obige Rohfettphase 1 über ein, den Siebrückstand kontinuierlich 55 kg/h Feststoff ausfragendes Bürstensieb 12 in einen von zwei parallel angeordneten, mit Propellerrührwerk ausgestatteten und Feststoffdosierschnecke versehenen 2 m³-Rührkessel 13 gefördert.

Nach Erreichen eines Befüllungsstandes von 70% werden über Feststoffdosiervorrichtung 36 kg Al₂(SO₄)₃ · 16 H₂O als Demulgator 2 und anschließend 23 kg Bleicherde als Adsorbens 3 unter Rühren in den Kessel gefördert. Nach 10minütigem Rühren folgt ein 5minütige Absitzzeit. Nun werden über eine Schmutzwasserpumpe 332 kg/h Aluminiumsulfatlösung, sedimentiertes Adsorbat und Schlamm über das Bodenablaßventil abgepumpt. Die aufschwimmende Fettphase wird über eine weitere Pumpe einem Dreiphasendekanter 14 zugeführt. Dort erfolgt die Abtrennung von Restwasser 11 und verbliebenen festen Bestandteilen 10. Der Dreiphasendekanter wird mit einer Trommeldrehzahl von 3100 min⁻¹, einer Differenzdrehzahl von 40 min⁻¹ und einer Arbeitstemperatur von 60°C betrieben. Die entwässerte Fettsäure/Fettsäureesterfraktion fällt mit 460 kg/h an. In dem nachgeschalteten Mischer 15 erfolgt die kontinuierliche Zugabe von 46 kg/h Ethylamin (Additivkomponente 4) zur Realisierung einer Additivierung im Molverhältnis 1 : 1.

Die Ausbeute an Biotreibstoff 5 bezogen auf eingesetztes Fett beträgt 96%.

Nach der Additivierung ergeben sich folgende Parameter für den erzeugten Biokraftstoff (Vergleich mit durchschnittlichen Werten von Dieselmkraftstoff und anderen Dieselmkraftstoffsubstituten):

Parameter	Dieselmkraftstoff (DK)	Pflanzenöl-methylester	Rapsöl	erfindungsgemäßer Biokraftstoff	Maßeinheit
Dichte	0,83	0,89	0,91	0,84	kg/dm ³
Wassergehalt	-	0,2	0,07	0,1	%
Glyceringehalt (frei und gebunden)	-	0,25	10...11	0,96	%
Iodzahl	-	105	108	50	g Iod/g
Neutralisationszahl	-	0,4	1,5	0,9	mgKOH/g
Neutralisationszahl 2. Titrationsstufe	-	-	-	161	mg KOH/g
Cetanzahl	50...54	53	40...44	49	
ISO 5165					
Heizwert	42,9	37,2	37,2	36,8	MJ/kg

Ein 5000 h-Motortest mit dem hergestellten erfindungsgemäßen Biotreibstoff zeigte keine außergewöhnlichen Verschleißerscheinungen oder Korrosionsschäden.

Ausgegangen wird von einem bereits vorbehandelten fett- bzw. fettsäurehaltigen Produkt aus der Sammlung von Fettabscheiderinhalten von Gaststätten und Großküchen. Der Stoff weist daher relativ geringe Wasser- und Fremdstoffgehalte auf. Die detaillierten Stoffparameter sind nachfolgend aufgeführt:

Parameter	Meßwert	Maßeinheit
Toluolunlöslicher Rückstand	15,3	%
Wassergehalt	30,5	%
Neutralisationszahl des toluolunlöslichen Rückstandes	156	mg KOH/g
Iodzahl des toluolunlöslichen Rückstandes	63	g Iod/g
Gehalt an freiem und gebundenem Glycerin	2,09	%

In einer Versuchsanlage mit einem Massendurchsatz von 100 kg/h wird aus einem auf 60°C beheizten 2 m³-Tank mittels einer Dickstoffpumpe über ein Saugrohr die obige Rohfettphase 1 über ein, den Siebrückstand diskontinuierlich in 10 min-Intervallen ausfragendes Rüttelsieb 12 mit einem mittleren Abtrag von 3 kg/h Feststoff in einen von zwei parallel angeordneten, mit Propellerrührwerk ausgestatteten und Feststoffdosierschnecke versehenen 150 l-Rührkessel 13 gefördert.

Nach Erreichen eines Befüllungsstandes von 75% werden über Feststoffdosiervorrichtung 2 kg 50%ige Schwefelsäure als Demulgator 2 und anschließend 0,5 kg Kieselgel als Adsorbens 3 unter Rühren in den Kessel gefördert. Nach 20minütigem Rühren folgt ein 10minütige Absitzzeit. Nun werden über eine Schmutzwasserpumpe 30 kg/h der Schwefelsäurelösung, sedimentiertes Adsorbat und Schlamm über das Bodenablaßventil abgepumpt. Die aufschwimmende Fettphase wird über eine weitere Pumpe einem Dreiphasendekanter 14 zugeführt. Dort erfolgt die Abtrennung von Restwasser 11 und verbliebenen festen Bestandteilen 10. Der Dreiphasendekanter wird mit einer Trommeldrehzahl von 2900 min⁻¹, einer Differenzdrehzahl von 45 min⁻¹ und einer Arbeitstemperatur von 65°C betrieben. Die entwässerte Fettsäure/Fettsäureesterfraktion fällt mit 54 kg/h an. In dem nachgeschalteten Mischer 14 erfolgt die kontinuierliche Zugabe von 3,3 kg/h eines technischen Gemischs von Ethylamin und Propylamin (Additivkomponente 4) zur Realisierung einer Additivierung im Molverhältnis 1 : 0,5.

Die Ausbeute an Biotreibstoff 5 bezogen auf eingesetztes Fett beträgt 96%.

Nach der Additivierung ergeben sich folgende Parameter für den erzeugten Biokraftstoff:

Parameter	erfindungsge- mäßiger Biotreibstoff	Maßeinheit
Dichte	0,84	kg/dm ³
Wassergehalt	0,1	%
Glyceringehalt (frei und gebunden)	1,97	%
Iodzahl	58	g Iod/g
Neutralisationszahl	18,7	mgKOH/g
Neutralisationszahl 2. Titrationstufe	147	mg KOH/g
Cetanzahl ISO 5165	49	
Heizwert	37,1	MJ/kg

Ein 2000 h-Motortest mit dem hergestellten erfindungsgemäßen Biotreibstoff zeigte keine außergewöhnlichen Verschleißerscheinungen oder Korrosionsschäden.

Patentansprüche

1. Biotreibstoff für motorische Blockheizkraftwerke auf der Basis von Fettsäure- und Fettsäureesternmischungen, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) die Summe des freien und gebundenen Glycerinanteils zwischen 0,5 und 5% liegt,
- b) der Anteil an freier Fettsäure, ausgedrückt durch die Neutralisationszahl mindestens 120 mg KOH/g beträgt,
- c) der Wassergehalt höchstens 0,5% ausmacht und
- d) ein basisches, stickstoffhaltiges Additiv in Form von Ammoniak oder vom Typ primäres oder sekundäres C₁–C₂₀-Alkylamin oder C₂–C₈-Aminoalkohol in Mengen zwischen 5 und 60 Mol% (molare Stoffmenge Stickstoff gegenüber der molaren Stoffmenge der freien Carboxylgruppen) vorhanden ist.

2. Biotreibstoff nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil an freier Fettsäure 0,7 bis 3% und die Neutralisationszahl mindestens 150 mg KOH/g beträgt.

3. Verfahren zur Herstellung von Biotreibstoff der Ansprüche 1 und 2 bei Temperaturen oberhalb von 50°C und Normaldruck, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) die erwärmten, Rohfette enthaltenden, heterogenen Stoffgemische einer mechanischen Vorreinigung unterzogen werden,
- b) in einer Rührkesselanordnung quasikontinuierlich eine Emulsionsspaltung der Fett-Wasser-Emulsion durchgeführt wird, indem 0,1 bis 40% eines bekannten Demulgators zudosiert und intensiv gerührt wird und
- c) gleichzeitig eine adsorptive Reinigung erfolgt, indem dem Rohfett in Abhängigkeit vom Grad der Verschmutzung im Rührbehälter, bezogen auf die eingesetzte Gesamtmasse, 3–15% Aktivkohle, Kieselgel oder Bleicherde zugesetzt werden und
- d) die Entfernung des Restwassers und verbliebener mechanischer Verunreinigungen in einem nachgeschalteten Dreiphasendekanter bei Trommeldrehzahlen von 2000 bis 4000 min⁻¹ und Differenzdrehzahlen von 20 bis 80 min⁻¹ durchgeführt wird und
- e) anschließend in einem weiteren Schritt das basische, stickstoffhaltige Additiv zugegeben wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Rührkesselanordnung aus zwei parallel geschalteten Apparaten besteht.

5. Verfahren nach den Ansprüchen 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Demulgator Al₂(SO₄)₃ · 16 H₂O in fester Form zudosiert wird.

6. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Arbeitstemperatur 60°C bis 65°C beträgt.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

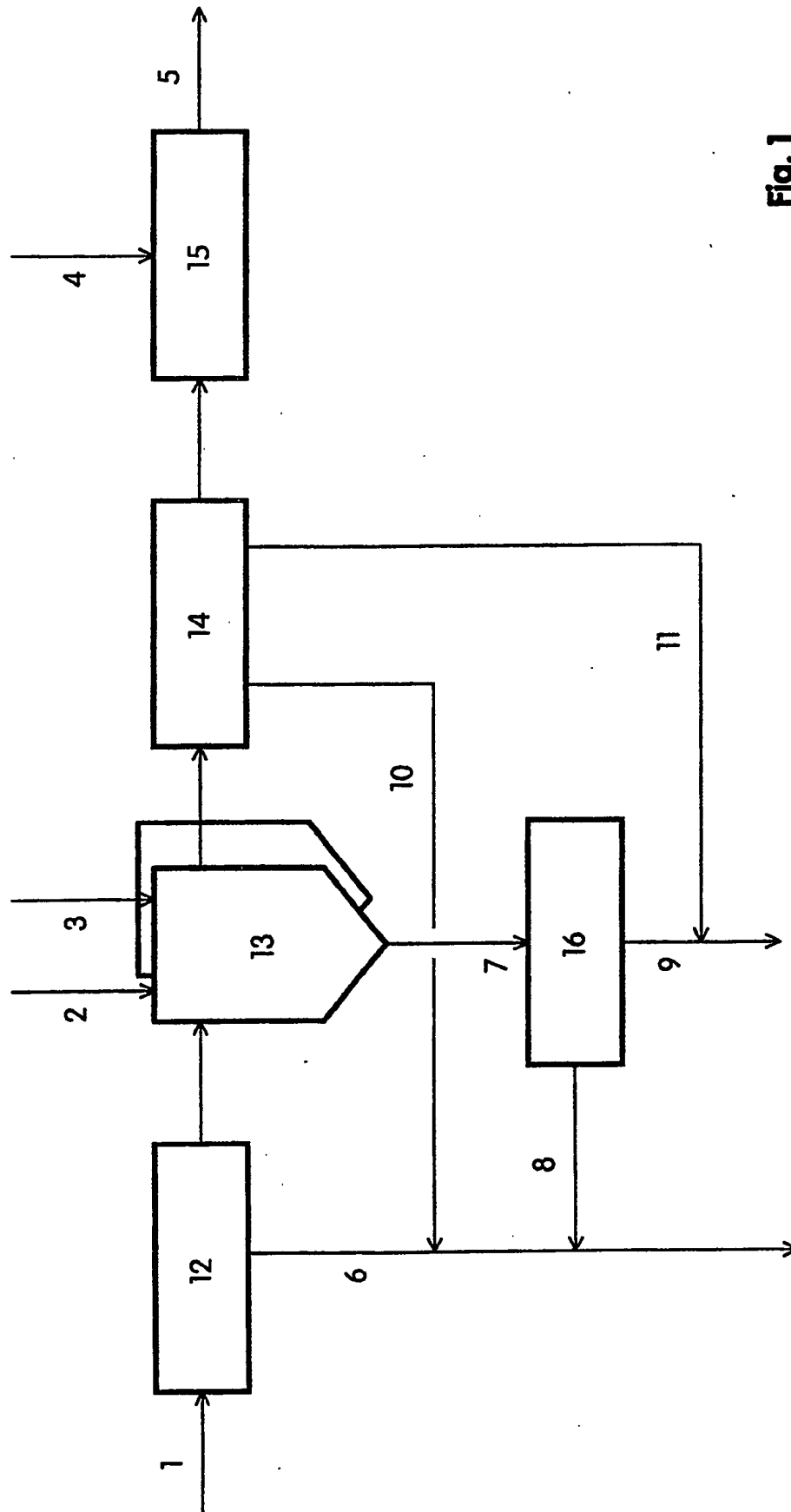


Fig. 1

☐ Generate Collection

L25: Entry 1 of 8

File: DWPI

Feb 14, 2000

DERWENT-ACC-NO: 2000-182674
 DERWENT-WEEK: 200029
 COPYRIGHT 2000 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Alkyl ester production for use in bio-fuels and lubricants

INVENTOR: FOX, R V; GINOSAR, D M

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE	CODE
LOCKHEED MARTIN IDAHO TECHNOLOGIES CO	LOCK

PRIORITY-DATA:

1998US-0094076

July 24, 1998

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
AU 9952250 A	February 14, 2000	N/A	000	C10L001/18
WO 200005327	February 3, 2000	E	016	C10L001/18 A1

DESIGNATED-STATES: AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CU CZ DE DK EE ES FI
 GB GE GH GM HR HU ID IL IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW
 MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT UA UG US UZ VN YU ZA ZW AT BE
 CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE SL SZ UG
 ZW

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	APPL-DESCRIPTOR
AU 9952250A	July 22, 1999	1999AU-0052250	N/A
AU 9952250A	N/A	WO 200005327	Based on
WO	July 22, 1999	1999WO-US16669	N/A 200005327A1

INT-CL (IPC): C10L 1/18; C10M 105/32; C11C 3/02

ABSTRACTED-PUB-NO: WO 200005327A

BASIC-ABSTRACT:

NOVELTY - Alkyl esters (116) are produced by dissolving glyceride- (100) or free fatty acid-containing substance and an alcohol (102) or water input into a critical fluid (104), and reacting glyceride- or free fatty acid-containing substance with an alcohol or water in the presence of a catalyst to produce final products.

USE - The alkyl esters are used as bio-fuels and lubricants. Bio-fuels are used as alternatives or additives to currently used petroleum-based automotive or other vehicular fuels and lubricants.

ADVANTAGE - The use of a critical fluid allows the use of a wide range of catalysts, both liquid phase and reusable solid phase acid or base catalysts. Solid phase catalysts have significant additional advantages by limiting unwanted side reactions and producing higher conversion rates of the desired products. With the reaction completed, the critical fluid medium also facilitates clean,

efficient separations. The ability of the critical fluid medium to solvate the reactants ~~eliminates the immiscible phases found in conventional processes.~~ The single phase reaction eliminates inter-phase mass transfer of the individual reactants and catalyst, thus greatly increasing the rate of reaction.

DESCRIPTION OF DRAWING(S) - The figure shows a simplified flow diagram for the glyceride reaction process employing a continuous reactor.

Glyceride containing feed 100

Alcohol input 102

Critical fluid 104

Alkyl esters (product) 116

ABSTRACTED-PUB-NO: WO 200005327A
EQUIVALENT-ABSTRACTS:

CHOSEN-DRAWING: Dwg.1/1

DERWENT-CLASS: D23 H06 H07
CPI-CODES: D10-B02; H06-B; H07-A;

End of Result Set

☐ Generate Collection

L24: Entry 1 of 1

File: DWPI

Feb 14, 2000

DERWENT-ACC-NO: 2000-182674
DERWENT-WEEK: 200029
COPYRIGHT 2000 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Alkyl ester production for use in bio-fuels and lubricants

INVENTOR: FOX, R V; GINOSAR, D M

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE	CODE
LOCKHEED MARTIN IDAHO TECHNOLOGIES CO	LOCK

PRIORITY-DATA:

1998US-0094076	July 24, 1998
----------------	---------------

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
AU 9952250 A	February 14, 2000	N/A	000	C10L001/18
WO 200005327	February 3, 2000	E	016	C10L001/18 A1

DESIGNATED-STATES: AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CU CZ DE DK EE ES FI
GB GE GH GM HR HU ID IL IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW
MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT UA UG US UZ VN YU ZA ZW AT BE
CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE SL SZ UG
ZW

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	APPL-DESCRIPTOR
AU 9952250A	July 22, 1999	1999AU-0052250	N/A
AU 9952250A	N/A	WO 200005327	Based on
WO	July 22, 1999	1999WO-US16669	N/A 200005327A1

INT-CL (IPC): C10L 1/18; C10M 105/32; C11C 3/02

ABSTRACTED-PUB-NO: WO 200005327A

BASIC-ABSTRACT:

NOVELTY - Alkyl esters (116) are produced by dissolving glyceride- (100) or free fatty acid-containing substance and an alcohol (102) or water input into a critical fluid (104), and reacting glyceride- or free fatty acid-containing substance with an alcohol or water in the presence of a catalyst to produce final products.

USE - The alkyl esters are used as bio-fuels and lubricants. Bio-fuels are used as alternatives or additives to currently used petroleum-based automotive or other vehicular fuels and lubricants.

ADVANTAGE - The use of a critical fluid allows the use of a wide range of catalysts, both liquid phase and reusable solid phase acid or base catalysts. Solid phase catalysts have significant additional advantages by limiting unwanted

side reactions and producing higher conversion rates of the desired products. With the reaction completed, the ~~critical fluid medium also facilitates clean,~~ efficient separations. The ability of the critical fluid medium to solvate the reactants eliminates the immiscible phases found in conventional processes. The single phase reaction eliminates inter-phase mass transfer of the individual reactants and catalyst, thus greatly increasing the rate of reaction.

DESCRIPTION OF DRAWING(S) - The figure shows a simplified flow diagram for the glyceride reaction process employing a continuous reactor.

Glyceride containing feed 100

Alcohol input 102

Critical fluid 104

Alkyl esters (product) 116

ABSTRACTED-PUB-NO: WO 200005327A

EQUIVALENT-ABSTRACTS:

CHOSEN-DRAWING: Dwg.1/1

DERWENT-CLASS: D23 H06 H07

CPI-CODES: D10-B02; H06-B; H07-A;

☐ Generate Collection

L25: Entry 6 of 8

File: DWPI

May 17, 1988

DERWENT-ACC-NO: 1988-173029
DERWENT-WEEK: 198825
COPYRIGHT 2000 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Gamma-linolenic acid fraction sepn. - by chromatography using super
critical fluid as mobile phase for sepn. from fatty acids mixt. obtd. by
hydrolysis of natural fats and oils

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE

CODE

AGENCY OF IND SCI & TECHNOLOGY

AGEN

PRIORITY-DATA:

1986JP-0259495

October 30, 1986

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 63112536 A	May 17, 1988	N/A	006	N/A
JP 89042933 B	September 18, 1989	N/A	000	N/A

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	APPL-DESCRIPTOR
JP63112536A	October 30, 1986	1986JP-0259495	N/A

INT-CL (IPC): B01D 15/08; C07C 51/47; C07C 57/12; C07C 67/56; C07C 69/58; C11C
1/08; G01N 30/00

ABSTRACTED-PUB-NO: JP63112536A

BASIC-ABSTRACT:

Seqn. procedure of gamma-linolenic acid fraction (I) from fatty acid mixt. (II) obtd. by hydrolysis of natural fats and oils or fatty acid lower alkyl esters mixt. (III) prepd. by ester exchange of natural fats and oils by chromatography using super critical fluid (IV) as mobile phase. Pref. (II) or (III) is treated with urea previously to concentrated (I). Pref. (IV) is carbon dioxide, flone, methane, ethane, small amt. of lower alcohol(s) or 5-6C satd. hydrocarbon may be added to (IV). Silica gel modified with octadecyl gp. etc., or styrene-dinvinylbenzene copolymer(s) is used as column packing, sepn. is carried out at 35-100 deg.C (40-60 deg.C), under 80-300 kg/sq.cmG, (90-250 kg/sq.cmG). Plant seed oil(s) or fungi extract etc. is used as source of (II) or (III).

ADVANTAGE - High purity (I) is obtd. in high revoery yield by simple, rapid procedure.

ABSTRACTED-PUB-NO: JP63112536A

EQUIVALENT-ABSTRACTS:

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

DERWENT-CLASS: E17

CPI-CODES: E10-C04H; E11-Q01;

☐ Generate Collection

L25: Entry 3 of 8

File: DWPI

Oct 2, 1996

DERWENT-ACC-NO: 1995-137169
 DERWENT-WEEK: 199644
 COPYRIGHT 2000 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Efficient extn. of fatty acid(s), eliminating deterioration by air oxidn. -
 by hydrolysing lipid sepd. from raw material at high temp. and pressure then
 extracting acids

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE	CODE
HITACHI LTD	HITA
ZH CHIKYU KANKYO SANGYO GIJITSU KENKYU	CHIKN

PRIORITY-DATA:

1993JP-0213089 August 27, 1993

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 2538753 B2	October 2, 1996	N/A	003	C11C001/04
JP 07062385 A	March 7, 1995	N/A	004	C11C001/04

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	APPL-DESCRIPTOR
JP 2538753B2	August 27, 1993	1993JP-0213089	N/A
JP 2538753B2	N/A	JP 7062385	Previous Publ.
JP07062385A	August 27, 1993	1993JP-0213089	N/A

INT-CL (IPC): C11B 1/12; C11C 1/04; C11C 1/08

ABSTRACTED-PUB-NO: JP07062385A

BASIC-ABSTRACT:

Extn. of fatty acids comprises hydrolysing a lipid sepd. from a natural lipid raw material at high temp. and high pressure in a super-critical fluid and then extracting the acids from the hydrolysate. Pref., hydrolysis is performed at 100-300 deg.C and 75-300 kg/cm2. Pref. extn. comprises hydrolysis followed by addn. of supercritical CO2 fluid to the hydrolysate at 31-200 deg.C and 80-400 kg/cm2 to extract the acids.

ADVANTAGE - Method permits simultaneous hydrolysis and sepn. through a single process and achieves high extn. efficiency of fatty acids, esp. high-added-value unsatd. fatty acids, without deterioration by air oxidn.

In an example, hydrolysing conditions for supercritical CO2 are pref. 75-200 kg/cm2, 100-200 deg.C and 2-5 hrs. The extracting conditions are pref. 150-300 kg/cm2, 31-100 deg.C and 30 minutes to 3 hrs. To perform selective dissolving of the acids, a solvent, such as methanol, N-hexane and/or acetonitrile, is opt. used together as an entrainer.

ABSTRACTED-PUB-NO: JP07062385A

EQUIVALENT-ABSTRACTS:

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

<u>DB Name</u>	<u>Query</u>	<u>Hit Count</u>	<u>Set Name</u>
DWPI	117 and biofuel	4	<u>L29</u>
DWPI	118 and biofuel	0	<u>L28</u>
DWPI	116 and biofuel	1	<u>L27</u>
DWPI	117 and 122	12763	<u>L26</u>
DWPI	118 and 117	8	<u>L25</u>
DWPI	118 and 116	1	<u>L24</u>
DWPI	118 and 1116	0	<u>L23</u>
DWPI	alcohol	169650	<u>L22</u>
DWPI	esterification	1	<u>L21</u>
DWPI	transesterification	1	<u>L20</u>
DWPI	transesterification	0	<u>L19</u>
DWPI	critical adj1 fluid	163	<u>L18</u>
DWPI	fatty adj1 acid	53382	<u>L17</u>
DWPI	glyceride	5371	<u>L16</u>
DWPI	114 near amino	3	<u>L15</u>
DWPI	hydrocarbyl adj1 polyoxyalkylene	19	<u>L14</u>
DWPI	19 and fuel	96	<u>L13</u>
DWPI	110 and polyoxyalkylene	1	<u>L12</u>
DWPI	110 and aminoalcohol	0	<u>L11</u>
DWPI	19 and fuel	96	<u>L10</u>
DWPI	17 and 13	241	<u>L9</u>
DWPI	17 and 14	0	<u>L8</u>
DWPI	two adj1 cycle	1784	<u>L7</u>
DWPI	14 and two adj1 cycle	0	<u>L6</u>
DWPI	14 and 13	9	<u>L5</u>
DWPI	Phillips adj1 'J'	422	<u>L4</u>
DWPI	606 adj1 oil	341492	<u>L3</u>
DWPI	hydrocarbyl adj1 polyoxyalkylene adj1 aminoalcohol	1	<u>L2</u>
DWPI	hydrocarbyl adj1 polyoxyalkylene adj1 amino adj1 alcohol	0	<u>L1</u>